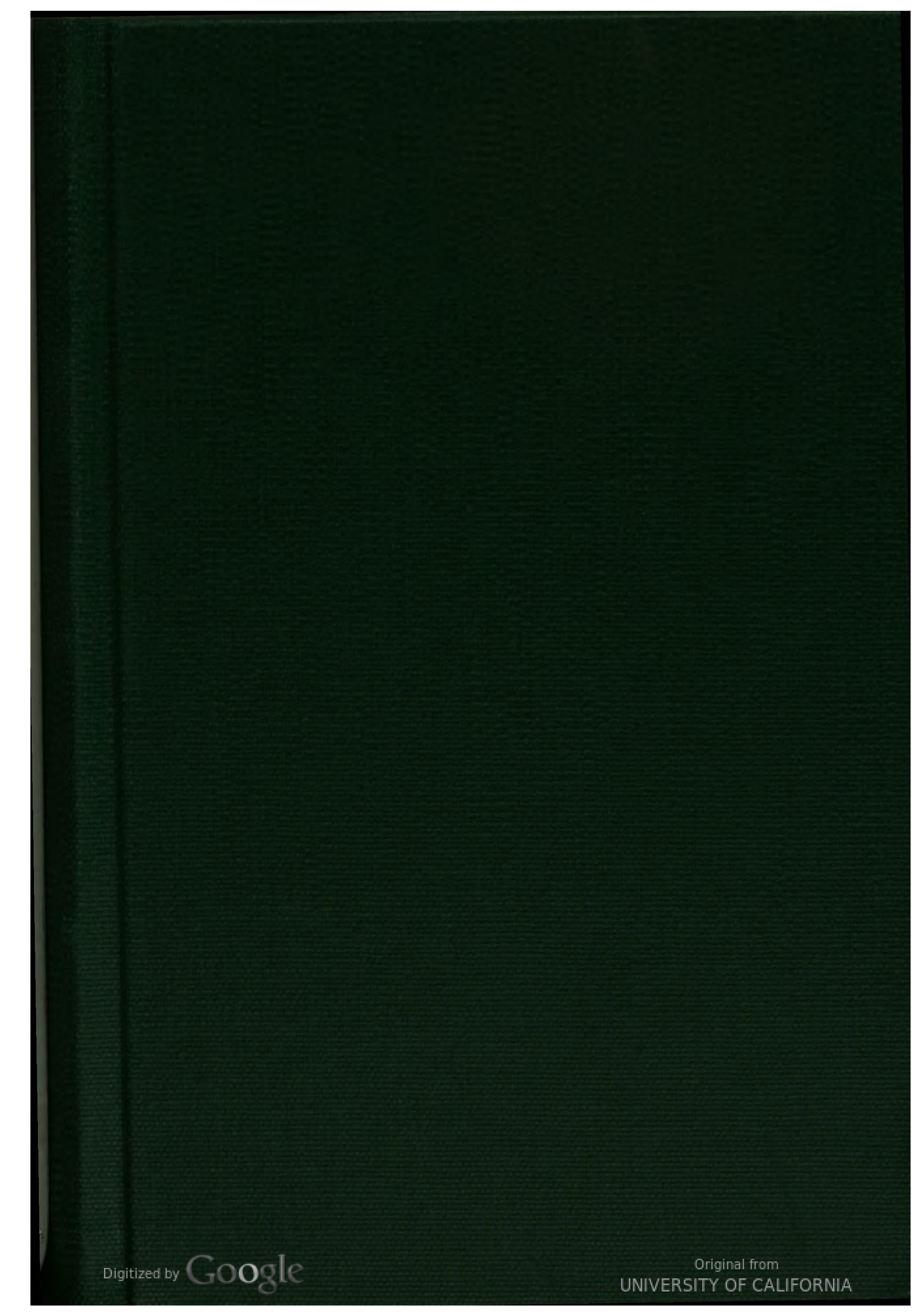
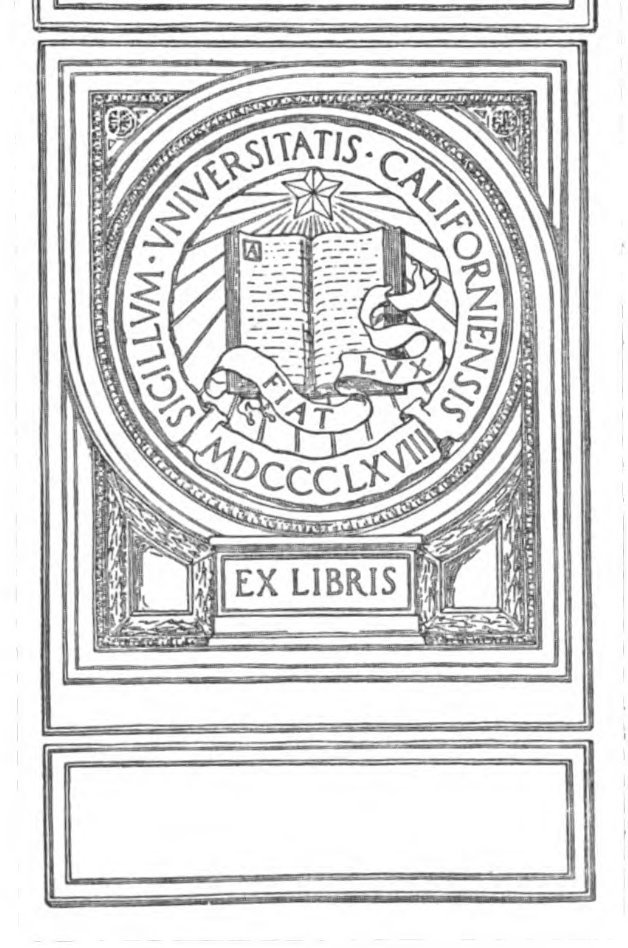



UNIVERSITY OF CALIFORNIA
SAN FRANCISCO MEDICAL CENTER
LIBRARY
SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS



N

Pr

# ZEITSCHRIFT
FÜR
# HYGIENE
UND
# INFEKTIONSKRANKHEITEN

HERAUSGEGEBEN

VON

**PROF. DR. C. FLÜGGE** UND **PROF. DR. F. NEUFELD**

GEH. MED.-RAT

GEH. MED.-RAT UND DIREKTOR
DES INSTITUTS FÜR INFEKTIONSKRANKHEITEN „ROBERT KOCH“ IN BERLIN

97. BAND

MIT 42 TEXTABBILDUNGEN



BERLIN
VERLAG VON JULIUS SPRINGER
1923

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig.

# Inhaltsverzeichnis.

(Aus der II. Medizinischen Universitätsklinik in Wien [Hofrat *Ortner*].)

# Zur Frage der sog. oligodynamischen Wirkungen.

## Versuche über Einfluß metallischen Kupfers auf Blutkatalase.

Von

**M. Händel** und **E. Segall.**

Mit 3 Textabbildungen.

In einer im Jahre 1887 erschienenen Dissertation von *Binnecker* finden wir zum erstenmal das Problem der katalytischen Wirkung von Schwermetallsalzen ausführlich behandelt. Er fand Fe-, Co-, Ni-, Zn-, Cd-, Mg-Sulfate in der erwähnten Reihenfolge als Sauerstoffüberträger an schweflige Säure wirksam. *Bigelow* nahm diese Untersuchungen auf und konnte nachweisen, daß aus verschiedenartigen Gefäßen stammendes Wasser sich verschieden in bezug auf die Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit der Oxydation von schwefliger zu Schwefelsäure verhält, während Wasser aus demselben Ballon immer annähernd konstante Resultate ergab. In einer posthumen, von *Schwendener* im Jahre 1893 herausgegebenen Arbeit *Nägelis* findet sich zum erstenmal der Begriff Oligodynamie. *Nägeli* beobachtete die schädigende Wirkung blanker Metalle auf pflanzliche Zellen und bemühte sich in ausgedehnten Untersuchungsreihen um die Aufklärung dieser Erscheinungen. Schon ihm war es aufgefallen, daß Glasgefäße, in denen Metalle gelegen waren, die Fähigkeit erhalten haben, gewisse pathologische Veränderungen an Pflanzenzellen hervorzurufen; diese Fähigkeit konnte auf $H_2O$ übertragen werden, was *Nägeli* veranlaßte, zunächst an eine besondere Kraft zu denken, die er Isagität benannt hat. Als es ihm aber gelang, in einem Rückstand des eingedämpften aktivierten Wassers Pb, Zn, Fe nachzuweisen, gab er die Idee von einer eigenen Kraft auf und nahm Lösungsvorgänge als Ursache an. *Israel* und *Klingmann* bestätigten im wesentlichen die Angaben *Nägelis*. *Schade v. d. Does* fand, daß Serum, welches mit metallischem Silber geschüttelt wurde, wochenlang steril blieb, obwohl es vor Keimen nicht geschützt wurde. *Miller* fiel die bactericide Wirkung mancher Goldsorten auf, *Behring* verfolgte diese Beobachtungen weiter und fand ähnliche Wirkungen bei As, Ag, Hg, Cu, Ni, Zn; er nimmt Auflösung der Metalle durch Bakterienstoffwechselprodukte als Ursache an.





Ähnliche Beobachtungen machten *Natoneck* und *Reitmann* und *Messerschmidt*; der letztere sah keimfreie Höfe auf Agarplatten, die mit französischen Geschossen in Berührung waren. *Hofmann* empfahl Cu, resp. Sn zur Wunddesinfektion, *Bohrtz* konnte die bactericide Wirkung der Metalle auf Asciteskulturen von Staphylokokken nachweisen. Alle genannten Autoren nahmen Lösungsvorgänge verschiedener Art als den untersuchten Erscheinungen zugrunde liegend an.

So stand die Sache, als das Problem im Jahre 1917 neuerdings von *Saxl* aufgerollt wurde. Im Gegensatz zu den bisherigen Autoren glaubte *Saxl* eine neue Eigenart zur Erklärung heranziehen zu müssen. „Die keimtötende Fernwirkung der Metalle beruht auf einer physikalischen Energie, die sich zunächst an der Oberfläche der Metalle abspielt, jedoch auch in andere Medien übergehen kann.“ Lösungsvorgänge hält er für nicht wesentlich. *Saxl* versuchte auch Metalle zur Trinkwassersterilisation zu verwenden. Wir verweisen in diesem Zusammenhange auf die Versuche von *Blondlot*, ponderable und inponderable Strahlen, die von der Oberfläche blanker Metalle ausgehen sollen, zu beweisen. Diese Beobachtungen wurden teilweise bestätigt, teilweise als subjektive Täuschungen des Entdeckers angesehen. Die Publikationen von *Saxl* riefen eine lebhafte Debatte und heftigen Widerspruch hervor. *Pfeiffer* und *Kadletz* schlossen sich zunächst der Ansicht *Saxls* an und glaubten eine eigene Kupfer- und Silberenergie annehmen zu müssen und in der Rötung von fuchsinschwefliger Säure einen Indicator dafür gefunden zu haben. Ähnliche Erscheinungen bei Gegenwart von Schwermetallsalzen hat schon, wie oben erwähnt, *Binnecker* beobachtet. Kurze Zeit darauf sahen *Pfeiffer* und *Kadletz* ihren Irrtum ein, zogen ihre Deutung zurück und stellten sich, wie alle Autoren, seither auf den Boden der Lösungstheorie. Zuerst und am entschiedensten sprachen sich *Baumgarten* und *Luger* gegen die *Saxl*sche Hypothese aus. Sie dehnten das Studium des oligodynamischen Phänomens, das bisher vornehmlich die Beeinflussung der Mikroorganismen zum Gegenstand hatte, auf Fermente und Toxine aus. In der Folge erschien eine Reihe von Arbeiten (*Doerr*, *Bail*, *Löhner*, *Salus*, *Spaet*, *Süpfle* u. a.), die sich einmütig der Ansicht *Baumgartens* und *Lugers* und der früheren Autoren anschlossen. Die hämolytische Wirkung blanker Metalle wurde von *Wollmann* festgestellt, dann von *Hess* und *Reitler*, *Hausmann* und *Kerl*, *Luger*, *Doerr* genauer untersucht. Man hat sich bemüht, die oligodynamischen Wirkungen auch praktisch zu verwerten. *Krämer* berichtet über gute Resultate bei der Wassersterilisation mittels Kupferplatten. *Saxl* versuchte Vaccinen, Impfstoffe u. dgl. herzustellen. *Laubenheimer* setzte die Beobachtungen von *Baumgarten* und *Luger* über Schädigung von Toxinen durch Metalle weiter fort und führte Immunisierungsversuche mit ge-



schädigtem Tetanus, Diphtherietoxin und Dysenterieendotoxin aus. Allerdings konnten *Erdstein* und *Fürth* mit geschädigten Toxinen keine Immunisierung durchführen und nehmen eine vollkommene Destruktion des Giftes an.

Wir möchten noch mit einigen Worten auf die Beeinflussung der Fermente zurückkommen. *Baumgarten* und *Luger* haben die Hemmung von Diastase und Trypsin durch blankes Kupfer und Silber festgestellt. *Langer* wies die Hemmung der Diastasewirkung in lebenden Pflanzenzellen nach. *Falta* und *Quittner* untersuchten die Wirkung von Kupfer, Quecksilber, Silber und anderen Schwermetallen auf einige chemische Umsetzungen, die auch durch Fermente in ihrem Reaktionsablauf verändert werden können. Sie fanden eine Entfärbung von $KMnO_4$, von Methylenblau und anderen Farbstoffen, Koagulation von Eiweiß durch oligodynamisch gemachte Eprouvetten, endlich Verzuckerung der Stärke durch mit Hg vorbehandelte Rosetiegel. Zuletzt hatte *Luger* den Einfluß bestimmter Salze, wie KCN, NaCl, $K_2S$, $Na_2S_2O_3$ auf vorher durch blankes Kupfer und Silber geschädigte Diastase studiert und die Möglichkeit einer Reaktivierung des oligodynamisch beeinflußten Fermentes durch die genannten Salze nachgewiesen.

Wir stellten uns nun die Aufgabe, die oligodynamischen Wirkungen auf Blutkatalaselösungen zu studieren, und wählten das Katalaseferment zum Gegenstand unserer Versuche aus dem Grunde, weil durch die Titrationsmethoden die Möglichkeit gegeben ist, die Beeinflussung gerade dieses Fermentes in ihren quantitativen Verhältnissen zu studieren und so vielleicht einen Einblick in den Mechanismus der untersuchten Reaktion zu gewinnen. Als Metall wählten wir blankes Kupfer, das uns wegen seiner kräftigen oligodynamischen Wirkung für unsere Versuche am geeignetsten schien.

Wir möchten zunächst einiges über die angewandte Methodik sagen und dann aus der großen Anzahl von Versuchen das Wichtigste herausgreifen und in Form von kurzen Versuchsprotokollen und Kurvendiagrammen vorbringen.

### *Methodisches.*

Versetzt man Blut mit $H_2O_2$, so wird dieses bekanntlich kräftig zersetzt. Als Ursache der Zersetzung gilt allgemein ein Ferment, welches Katalase genannt wird. Die Zersetzung läßt sich durch Zurücktitrieren des nach einer bestimmten Zeit unzersetzt gebliebenen $H_2O_2$ mittels gestellter $KMnO_4$-Lösung leicht quantitativ verfolgen. Wir zogen 50 cmm Blut aus der Fingerbeere auf und gaben sie in 50 ccm destilliertes Wasser; 5 ccm davon wurden dann mit gekupfertem Wasser oder einer anderen zu untersuchenden Flüssigkeit versetzt, hierauf mit 5—10 ccm einer zirka 1 proz. $H_2O_2$-Lösung, und wie in den einzelnen Versuchen näher angegeben, titriert. Unsere $KMnO_4$-Lösung war 3,72 ‰. Wir legten





dabei kein Gewicht auf absolute Genauigkeit, sondern wählten die Versuchsanordnung so, daß wir die Hemmung der Katalasewirkung durch gekupfertes Wasser, Cu-Draht oder $CuSO_4$-Lösungen deutlich feststellen konnten.

Versuch 1.

Je 5 ccm der Blutlösung wurden in

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Reagensglas | 1 | mit | 5 ccm dest. $H_2O$ | |
| ,, | 2 | ,, | 5 ,, ,, ,, | und einem Cu-Stab |
| ,, | 3 | ,, | 5 ,, ,, ,, | |
| ,, | 4 | ,, | 5 ,, ,, ,, | und einem Cu-Stab |

versetzt und die Reagensgläser 1 und 2 durch 2 Tage im Dunkeln, die Reagensgläser 3 und 4 ebenso lange im Lichte stehen gelassen. Hierauf wurde in jedes Reagensglas 5 ccm $H_2O_2$ gegeben und nach einiger Zeit die übriggebliebene Menge $H_2O_2$ mittels $KMnO_4$ nach $H_2SO_4$ Zusatz titriert. Es wurden für

| | | |
|---|---|---|
| Reagensglas | 1 . . . . . . . . . . | 16,6 ccm |
| ,, | 2 . . . . . . . . . . | 21,0 ,, |
| ,, | 3 . . . . . . . . . . | 24,5 ,, |
| ,, | 4 . . . . . . . . . . | 33,2 ,, |

der $KMnO_4$-Lösung verbraucht. Es zeigt sich, daß blankes Cu sowohl im Licht als auch im Dunkeln die Katalasewirkung hemmt, und zwar im Licht wesentlich stärker.

Versuch 2.

Der nächste Versuch wurde analog ausgeführt; nur wurde jetzt in die Eprouvetten 3 und 4 physiologische NaCl-Lösung statt destillierten Wassers gegeben und alle 4 Reagensgläser im Lichte stehen gelassen. Zum Zurücktitrieren des unzersetzt gebliebenen $H_2O_2$ waren für

| | | |
|---|---|---|
| Reagensglas | 1 . . . . . . . . . . | 0,9 ccm |
| ,, | 2 . . . . . . . . . . | 15,1 ,, |
| ,, | 3 . . . . . . . . . . | 6,9 ,, |
| ,, | 4 . . . . . . . . . . | 29,9 ,, |

$KMnO_4$-Lösung erforderlich.

Blankes Kupfer hemmt somit die $H_2O_2$-Zersetzung durch Katalase in physiologischer Kochsalzlösung stärker als in Wasser.

Versuch 3.

Hierauf ließen wir ein Reagensglas mit 5 ccm der Blutlösung, 5 ccm Wasser und blankem Cu-Draht stehen, gossen dann nach 6 Tagen alles weg und gaben in dieses sowie in ein nicht vorbehandeltes Reagensglas je 5 ccm Blutlösung und 5 ccm $H_2O_2$-Lösung und titrierten in der beschriebenen Weise nach einer Stunde das $H_2O_2$ zurück. Es wurden verbraucht für

| | | |
|---|---|---|
| Reagensglas | 1 . . . . . . . . . . | 12.4 ccm |
| ,, | 2 . . . . . . . . . . | 3,1 ,, |

$KMnO_4$-Lösung.

Glas, das mit blankem Cu und $H_2O$ in Berührung war, hemmt also die Katalasewirkung.

Versuch 4.

Wir versuchten weiter die Wirkung des mit Cu in Kontakt gewesenen Wassers festzustellen und stellten zwei Reagensgläser mit 5 ccm Blutlösung + 5 ccm $H_2O$ resp. 5 ccm Blutlösung + 5 ccm durch 2 Wochen gekupferten Wassers auf. Nach einem Tage wurden je 5 ccm $H_2O_2$-Lösung zugesetzt und nach 1 Stunde titriert.



Verbrauch an $KMnO_4$:

| | | |
|---|---|---|
| Reagensglas | 1 . . . . . . . . . . | 14,6 ccm |
| „ | 2 . . . . . . . . . . | 24,8 „ |

### Versuch 5.

Je 5 ccm 1 proz. $H_2O_2$-Lösung wurden in 2 Reagensgläser gegeben; in das zweite Reagensglas wurde außerdem ein Cu-Draht gesteckt und nach 2 Stunden wurde zum Zurücktitrieren für

| | | |
|---|---|---|
| Reagensglas | 1 . . . . . . . . . . | 17,4 ccm |
| „ | 2 . . . . . . . . . . | 17,7 „ |

$KMnO_4$-Lösung verbraucht.

Die Spontanzersetzung von $H_2O_2$ wird also durch blankes Cu nicht wesentlich beeinflußt.

### Versuch 6.

Wir versuchten nun die Wirkung blanken Kupfers durch verdünnte $CuSO_4$-Lösungen nachzumachen. Zu diesem Zwecke gaben wir je 5 ccm Blutlösung in 4 Kölbchen und ins erste Kölbchen außerdem 5 ccm $H_2O$ und einen Cu-Draht, ins zweite 5 ccm einer $^n/_{2000}$-$CuSO_4$-Lösung, ins dritte 5 ccm $^n/_{5000}$-$CuSO_4$- und in das vierte 5 ccm $^n/_{10\,000}$-$CuSO_4$-Lösung. Es wurden dann nach einigen Tagen je 10 ccm $H_2O_2$-Lösung in die Kölbchen gegeben und nach je 2, 5 und 10 Minuten je 5 ccm aus jedem Kölbchen titriert. Es wurden in Kölbchen 1

| | | | | | Reaktionskonstanten 0,4343 K |
|---|---|---|---|---|---|
| nach | 2 | Minuten | 12,7 ccm | $KMnO_4$ | |
| „ | 5 | „ | 11,0 „ | „ | 0,0208 |
| „ | 10 | „ | 10,5 „ | „ | 0,0040 |

verbraucht. Die analoge Titration ergab für das 2. Kölbchen

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| nach | 2 | Minuten | 14,0 ccm | $KMnO_4$ | |
| „ | 5 | „ | 13,1 „ | „ | 0,00962 |
| „ | 10 | „ | 12,8 „ | „ | 0,00201 |

Für das 3. Kölbchen

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| nach | 2 | Minuten | 13,5 ccm | $KMnO_4$ | |
| „ | 5 | „ | 12,5 „ | „ | 0,01114 |
| „ | 10 | „ | 12,1 „ | „ | 0,00282 |

Für das 4. Kölbchen

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| nach | 2 | Minuten | 13,2 ccm | $KMnO_4$ | |
| „ | 5 | „ | 12,1 „ | „ | 0,0126 |
| „ | 10 | „ | 11,3 „ | „ | 0,00594 |

Es ergibt sich aus den angeführten Zahlen, Kurven und Reaktionskonstanten, daß die Hemmung der Katalasewirkung durch stark verdünnte $CuSO_4$-Lösungen und durch blankes Cu sowohl der absoluten Größe als dem Verlaufe nach, wie aus den Konstanten zu ersehen ist, in ganz analoger Weise geschieht.

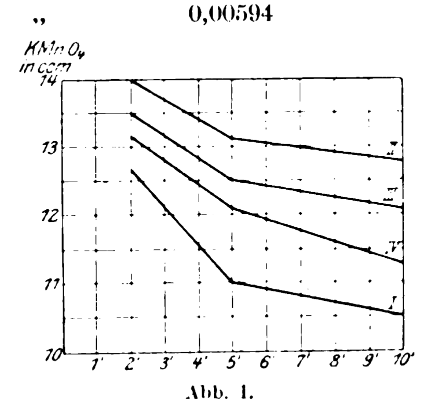


Abb. 1.

### Versuch 7.

In 2 Kolben wurden 5 ccm Blutlösung + 5 ccm $H_2O$ bzw. 5 ccm Blutlösung + 5 ccm $H_2O$ + Cu-Stab einen Tag lang stehen gelassen und hierauf je 10 ccm $H_2O_2$ zugesetzt. Nach 2,5- und 10-Minuten-Titration war der Verbrauch an $KMnO_4$ für Kolben 1

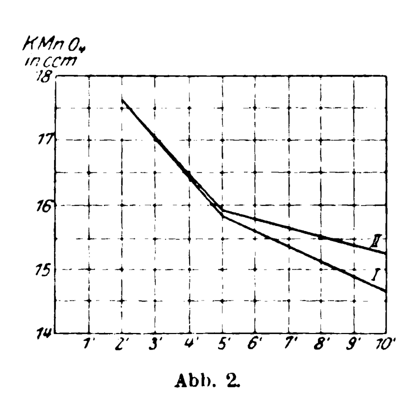


Abb. 2.

| | | | | Reaktionskonstanten 0,4343 K |
|---|---|---|---|---|
| nach | 2 | Minuten | 17,7 ccm | |
| „ | 5 | „ | 15,8 „ | 0,01643 |
| „ | 10 | „ | 14,7 „ | 0,00626 |

Für Kolben 2

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| nach | 2 | Minuten | 17,7 ccm | |
| „ | 5 | „ | 15,9 „ | 0,0155 |
| „ | 10 | „ | 15,3 „ | 0,00334 |

Es ergibt sich wieder ein ganz analoger Verlauf der Reaktion, die beiden Kurven folgen ungefähr dem Gesetz monomolekularer Reaktionen.

### Versuch 8.

5 ccm Blutlösung wurden mit 5 ccm $H_2O$ + Cu bzw. 5 ccm gekupfertem $H_2O$ bzw. mit 5 ccm $^n/_{5000}$-$CuSO_4$-Lösung einen Tag stehen gelassen, hierauf wurden je 10 ccm $H_2O_2$ zugesetzt und wie oben titriert. Es wurden verbraucht: Für Kölbchen 1 (5 ccm $H_2O$ + Cu-Stab)

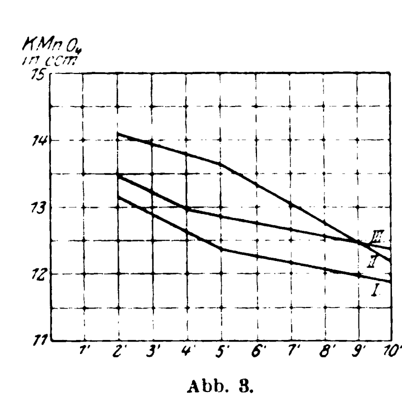


Abb. 3.

| | | | | | Reaktionskonstanten 0,4343 K |
|---|---|---|---|---|---|
| nach | 2 | Minuten | 13,1 ccm | $KMnO_4$ | |
| „ | 5 | „ | 12,4 „ | „ | 0,00795 |
| „ | 10 | „ | 11,9 „ | „ | 0,00357 |

Für Kölbchen 2 (5 ccm gekupfertes Wasser)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| nach | 2 | Minuten | 14,1 ccm | $KMnO_4$ | |
| „ | 5 | „ | 13,6 „ | „ | 0,00522 |
| „ | 10 | „ | 12,1 „ | „ | 0,01015 |

Für Kölbchen 3 (5 ccm $^n/_{5000}$-$CuSO_4$-Lösung)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| nach | 2 | Minuten | 13,5 ccm | $KMnO_4$ | |
| „ | 5 | „ | 12,9 „ | „ | 0,00658 |
| „ | 10 | „ | 12,4 „ | „ | 0,00343 |

Der Verlauf der Kurven ist wieder ein ganz analoger, die Reaktionskonstanten nehmen durchwegs zu.

Wenn wir kurz auf die Erklärungsversuche der oligodynamischen Wirkungen eingehen wollen, so müssen wir die physikalisch-chemischen und die rein physikalischen Theorien auseinanderhalten. Fast alle Autoren, die sich mit dem Problem beschäftigt haben, schreiben, wie oben erwähnt, dem Lösungsvorgange die hauptsächlichste Rolle zu. In Einzelheiten weichen die Autoren nicht unerheblich voneinander ab. Wir möchten hier nur die neueren Arbeiten erwähnen. *Thiele* und *Wolf* studierten eingehend die elektro-chemischen Vorgänge beim Einbringen blanker Metalle und Metallkombinationen in Flüssigkeiten,

Bakterienaufschwemmungen und Gallerten und konnten sich von der Wirkung besonderer Energiearten nicht überzeugen. *Messerschmidt* gelangt auf Grund zahlreicher Versuche zur folgenden Zusammenfassung: „Die keimtötende Wirkung wird verursacht durch verschiedene Cu-Verbindungen, die sich über das basische Cu-Carbonat in dem Nährboden bilden. Es entstehen aus diesen anfangs Cuproverbindungen, die durch Aufnahme von O in Cupriverbindungen übergehen. Als keimtötend wird ein Cu-Salz, das im Nährboden ohne Bakterienwirkung entsteht, angesprochen, und zwar wahrscheinlich das Kupferlactat. Eine Cu-Peptonverbindung hatte keine desinfizierenden Wirkungen.“ *Spiro* faßt seine Ansicht über oligodynamische Wirkungen dahin zusammen, daß Cu in kleinsten Mengen im Nährboden in Lösung geht. Dann wird das Cu unter Vermittlung einer von der Oberfläche der Zellen stammenden Substanz oxydiert, von Zellbestandteilen gebunden, und da das Cu so aus der Lösung geschwunden ist, können bei Anwesenheit von metallischem Cu neue Mengen in Lösung gehen, die weiter oxydiert und gebunden werden. Die Bindung ist eine Verteilung, Adsorption oder chemische Reaktion. Gegen Verteilung spricht, daß in der Zelle eine größere Konzentration an Cu herrscht als außen. Die Adsorption ist sehr wahrscheinlich, da gerade aus verdünnten Lösungen mehr adsorptiert wird als aus konzentrierten, und darum handelt es sich bei der oligodynamischen Wirkung. Die oligodynamische Wirkung wird durch all das begünstigt, was die Löslichkeit fördert. Es bilden sich dabei komplexe Cu-Salze, die schädigend auf Zellen einwirken. *Pauli* untersuchte die Metalleiweißverbindungen auf ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften; er kommt zum Schluß, daß es sich um Adsorptionsverbindungen handelt. *Doerr* konnte durch Konzentrieren aktivierter Lösungen die Wirksamkeit proportional steigern, durch Verdünnen verringern. Er faßt seine Resultate folgendermaßen zusammen: „Wasser, das durch längeren Kontakt mit metallischem Silber bactericid geworden ist, zeigt alle Eigenschaften der Lösung eines Desinfektionsmittels, es läßt sich verdünnen oder konzentrieren, wobei die Änderung der Intensität der Bactericidie der rechnungsgemäßen Erwartung entspricht. Ins Destillat geht der Träger der Bactericidie nicht über. Kochen vermindert die bactericide Wirkung nicht.“ Lösungen von Ag-Salzen zeigen die gleichen Eigenschaften. Möglicherweise ist $Ag_2O$ der Träger der oligodynamischen Wirkung. Im Gegensatz zu allen diesen Autoren und noch anderen, die wir hier im einzelnen nicht anführen können, steht, wie schon oben erwähnt, *Saxl* auf dem Standpunkte, daß die Lösungsvorgänge zur Erklärung nicht genügen, und daß man gezwungen ist, irgendeine unbekannte physikalische Energie anzunehmen. In seiner letzten Arbeit faßt er noch einmal die Gründe zusammen, die ihn zu

dieser Anschauung bewogen. Wir wollen auf einige Tatsachen, die nach *Saxls* Ansicht der Lösungstheorie im Wege stehen, eingehen.

Wir möchten zunächst dem oligodynamischen Grundversuch, der Bildung scharf begrenzter keimfreier Höfe um Metalle auf festen Nährböden unsere Aufmerksamkeit schenken. Bringt man einen Metalldraht auf eine beimpfte Agarplatte, so wachsen die Keime in einer scharf begrenzten nicht selten von einem Randwulst (*Löhner*) eines vermehrten Wachstums umgebenen Zone überhaupt nicht. *Luger* studierte diese Hofbildung genauer und konnte gelegentlich auch konzentrische Ringe verdichteten und normalen Bakterienwachstums beobachten. Er erklärt die scharfe Hofbildung durch die den Gallerten zukommenden Diffusionsbedingungen die schon von *Bechhold* und *Ziegler* des genaueren untersucht worden waren.

Als Stütze für diese Anschauung führen wir noch die Beobachtung *Bechholds*, daß die Größe des Hofes bei Anwendung von Ag-Salzen von deren Löslichkeit abhängig ist, an. Erwähnt sei auch, daß im Jahre 1906 *Liesegang* ähnliche Erscheinungen beobachtet hatte. Er hat damals schon die Ringbildung bei Diffusion von $AgNO_3$ in die KBr-Gallerte als eine scheinbare chemische Fernwirkung bezeichnet und durch ungleichmäßigen Salzgehalt der Gallerte erklärt.

*Saxl* fand im Gegensatz zu *Doerr*, daß NaCl die desinfektorische Metallwirkung stets fördert. Wir selbst konnten bei Verwendung der physiologischen Kochsalzlösung eine stärkere hemmende Wirkung des Kupfers auf Katalase feststellen. Diese Gegensätze lassen sich leicht aufklären. Ag-Ionen können einerseits durch Cl-Ionen gefällt werden, andererseits durch Bildung von Komplexsalzen mit AgCl dieses aus der Lösung abfangen und so die Lösung neuer Mengen von Ag ermöglichen (*Nernst*). *Weltmann* findet bei Zusatz von 4 % NaCl ebenfalls Förderung der oligodynamischen Wirkung von Hg-Oxyd, die er auf leichtere Löslichkeit von Hg-Oxyd bei Gegenwart von NaCl zurückführt.

Die Beobachtung *Saxls* über die Wirkung festen Sublimats durch die Luft hindurch wurde vielfach nachgeprüft und die Tatsache, nicht aber die Deutung bestätigt. In sehr einfacher Weise konnte auch der Mechanismus dieser Erscheinung erklärt werden. (*Spaet*, *Luger*, *Süpfle*.) In seiner letzten Publikation glaubt *Saxl* noch immer nicht recht an die Verdampfung als Hauptträgerin des Vorgangs, ohne neue Gründe für seine Anschauung anzuführen.

Als wichtigste Leistung der oligodynamisch wirksamen Substanzen hebt *Saxl* hervor, daß dieselben nicht nur das umgebende Wasser, sondern auch die Glasgefäße so aktivieren können, daß nach gründlichem Auswaschen oder Auswischen die bactericide Wirkung erhalten bleibt. *Schlossberger* konnte jedoch diese Angabe nicht be-

stätigen; es lassen sich aktivierte Gefäße so auswaschen, daß sie ihre Wirkung verlieren. Wir können aus eigener Erfahrung *Schlossbergers* Angaben beipflichten.

Zu der Beobachtung, daß $AgNO_3$ in Konzentrationen 1 : 10 000 000 Glasgefäße nicht mehr aktiviert, während mit Ag aktiviertes $H_2O$, das sicher nicht einen Bruchteil dieser Konzentration an Ag enthält, noch aktivierende Wirkung hat, ist folgendes zu bemerken. Die Tatsache, daß konzentriertere Ag-Salzlösungen weniger wirksam sein können als verdünntere, wäre nur dann mit der Lösungstheorie unvereinbar, wenn der *Behring*sche Grundsatz der Desinfektion zu Recht bestünde, daß Schwermetallsalze nur im Verhältnis zur gelösten Metallmenge wirksam sind. Nun wurde von *Spiro*, *Schraut* und *Schoeller* und anderen gezeigt, daß die Art der Anionen, namentlich bei komplexen Salzen, von wesentlichem Einfluß auf die Desinfektionskraft ist.

Bezüglich der Tatsache, daß die Wirkung von Metallen und Metallkombinationen nicht der Spannungsreihe entspricht, möchten wir glauben, daß auch daraus kein Beweis für das Bestehen einer eigenen Energie abgeleitet werden kann. Die Metalle müßten ja bei den komplizierten Reaktionsverhältnissen in den eiweißhaltigen Gallerten durchaus nicht der Spannungsreihe entsprechen, zumal gleiche Metalle verschiedener Provenienz oder dasselbe Metallstück je nach seiner Vorbehandlung und je nach den Bakterien, auf die sie einwirken, sich sehr verschieden verhalten. (*Doerr*, *Bail.*) *Thiele* und *Wolf*, die gerade diese Frage genauer untersucht haben, kamen schließlich zum Schlusse, daß sich alle genannten Erscheinungen durch physikalisch-chemische Vorgänge erklären lassen.

Sublimat entfärbt eine Permanganatlösung nicht, wohl aber eine durch Sublimat aktivierte Glasflasche. Diese Erscheinung ist durchaus nicht so rätselhaft, da ein Basenaustausch zwischen Salzlösung und Glaswand erfolgt und das gleiche Metallion, mit verschiedenen Anionen verbunden, wie wir oben betont haben, verschieden reagiert (Basenaustausch der Permutite *Nernst*, *Rothmund* und *Kornfeld*, *Kiser*).

Daß sich Metalle im destillierten $H_2O$ lösen, wird wohl allgemein zugegeben. *Acel* und andere konnten das Metall in aktivierten Flüssigkeiten direkt nachweisen. Nach einer von *Nernst* vor längerer Zeit entwickelten Theorie haben alle Metalle einen bestimmten Lösungsdruck, der bei manchen enorm groß ist. Nach den Untersuchungen aus der letzten Zeit beträgt derselbe für

Zn 10 43 Atmosphären
Cu $10^{-12}$
Ag $10^{-15}$ (*Hollemann*: Anorg. Chemie).



*Saxl* glaubt erweisen zu können, daß vorläufig dem Nachweis der Löslichkeit des Ag keine Beweiskraft in dem Sinne zukommt, daß die oligodynamische Wirkung durch das Vorhandensein der gelösten Metallverbindung zustande kommt, denn nach Angaben von *Salus* gäbe es Cu-Lösungen, die nicht oligodynamisch wirken, anderseits aktiviertes $H_2O$, in dem Cu nicht mehr nachweisbar ist. Wir müssen demgegenüber immer wieder auf die Tatsache hinweisen, daß es auf die Eigenart des Kations sowohl wie des Anions bei der oligodynamischen Wirkung ankommt.

Die Frage der Konzentration und Verdünnung der aktivierten Flüssigkeiten und ihrer biologischen Wirkung ist noch nicht spruchreif genug, um auf sie genauer einzugehen. Die Vorgänge scheinen hier sehr kompliziert zu liegen, und die Befunde der einzelnen Autoren weichen auch zu sehr voneinander ab.

Ähnlich liegen die Verhältnisse bei Fermenten. Es ist erstaunlich genug, daß Regelmäßigkeiten, wie sie unsere Kurven zeigen, auftreten. Jedenfalls sprechen unsere Versuche dafür, daß kein wesentlicher Unterschied zwischen verdünnten $CuSO_4$-Lösungen und durch Cu aktiviertem Wasser zu finden ist. Die Heranziehung besonderer Kräfte scheint uns überflüssig zu sein; es handelt sich um Lösungsvorgänge, die mit anderen physikalisch-chemischen Erscheinungen (Adsorption u. a.) einhergehen.

*Zusammenfassung.*

1. Die Blutkatalase wird durch metallisches Kupfer geschädigt, während die Spontanzersetzung von $H_2O_2$ nicht beeinflußt wird.

2. Die Schädigung äußert sich ceteris paribus stärker im Licht als im Dunkeln, bei Anwendung physiologischer NaCl-Lösung stärker als bei Anwendung von Wasser.

3. Gekupfertes $H_2O$ und Glasgefäße wirken wie blankes Kupfer.

4. Die gefundene Wirkung des blanken Cu auf Katalase zeigt also die charakteristischen Merkmale der sog. oligodynamischen Wirkungen.

5. Der zeitliche Reaktionsablauf der $H_2O_2$-Zersetzung durch Katalase, der, wie *Senter* zeigte, im Sinne einer monomolekularen Reaktion verläuft, erfolgt auch bei Anwesenheit von blankem Cu resp. $CuSO_4$ annähernd nach dem Gesetze der monomolekularen Reaktion.

6. *Unsere Versuche können durch Lösungsvorgänge erklärt werden. Für die Annahme einer besonderen Energie besitzen wir keine Anhaltspunkte.*

Vorliegende Versuche sind zum größten Teil im Sommer 1920 ausgeführt worden.



## Literaturverzeichnis.

Einige hier nicht zitierte Arbeiten finden sich bei *Messerschmidt*.

[1]) *Aczel*, Biochem. Zeitschr. **112**. — [2]) *Ascoli* u. *Novello*, C. r. Soc. biol. 1908, S. 65, — [3]) *Baumgarten* u. *Luger*, Wiener klin. Wochenschr. 1917, S. 1222. — [4]) *Baumgarten* u. *Luger*, ebenda 1917, S. 1224. — [5]) *Baumgarten* u. *Luger*, ebenda S. 1259. — [6]) *Baumgarten* u. *Luger*, ebenda 1918, S. 188. — [7]) *Bail*, ebenda 1919, S. 751. — [8]) *Bechhold*, Kolloidzeitschr. 1919, 25. — [9]) *Bechhold* u. *Ziegler*, Zeitschr. f. physikal. Chemie 1906, 56. — [10]) *Behring*, Desinfektionslehre. 1913. — [11]) *Beyer*, zit. n. Baumgartens Jahrbüchern 1898, S. 20. — [12]) *Binnecker*, Inaug.-Dissert., Tübingen 1887. — [13]) *Bigelow*, Zeitschr. f. physikal. Chemie **26**. — [14]) *Bitter*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **69**. — [15]) *Blondlot*, zit. n. Mayer, Bl. N-Strahlen. 1904. — [16]) *Bohrtz*, zit. n. Behring. — [17]) *Busson*, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. **58**. — [18]) *Crede* u. *Beyer*, Ag und Ag-Salze als Antiseptica. — [19]) *Deussen*, Zeitschr. f. Hyg. **85**. — [20]) *Doerr*, Biochem. Zeitschr. **106**. — [21]) *Doerr*, ebenda **107**. — [22]) *Doerr*, ebenda **113**. — [23]) *Erdstein* u. *Fürth*, ebenda **118**. — [24]) *Falta* u. *Quittner*, ebenda **115**. — [25]) *Ficker*, Zeitschr. f. Hyg. **29**. — [26]) *Graßberger*, Handb. d. Hyg. von Gruber u. Rubner. — [27]) *Hausmann*, Strahlentherapie, 1919 — [28]) *Kerl*, Biochem. Zeitschr. **112**. — [29]) *Heß* u. *Reitler*, Med. Klin. 1920, S. 1976. — [30]) *Heß* u. *Reitler*, Biochem. Zeitschr. **123**. — [31]) *Hoeber*, Physikalische Chemie der Zelle, 3. Aufl. 1911, S. 150. — [32]) *Hofmann*, zit. n. *Behring*. — [33]) *Huene*, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. 1909. — [34]) *Jacoby*, Biochem. Zeitschr. **104**. — [35]) *Jennings*, Journ. of physiol. 1897, 21. — [36]) *Jolles* u. *Oppenheim*, Virchows Archiv **180**. — [37]) *Israel* u. *Klingmann*, ebenda **147**. — [38]) *Kahlenberg* u. *True*, Journ. of the Amer. med. assoc. 1896. — [39]) *Kiser*, zit. n. *Nernst*. — [40]) *Köhler*, Zentralbl. f. Physiol. 1920, 34. — [41]) *Krämer*, Amer. journ. of pharm. 1906. — [42]) *Labendzinski*, Inaug.-Diss. Breslau 1904. — [43]) *Langer*, Wiener klin. Wochenschr. 1917, S. 1260. — [44]) *Laubenheimer*, Zeitschr. f. Hyg. **92**. — [45]) *Liesegang*, Annalen d. Physik **19**. 1906. — [46]) *Linden*, Beitr. z. Klin. d. Tuberkul. **34**. 1915. — [47]) *Linden*, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkr. 1922. — [48]) *Lockemann*, *Thies* u. *Wichern*, Zeitschr. physiol. Chemie **58**. 1909. — [49]) *Löhner*, Med. Feldblatt d. 10. Armee 1917, S. 10. — [50]) *Löhner*, Wiener klin. Wochenschr. 1919, S. 911. — [51]) *Luger*, ebenda 1920, S. 833. — [52]) *Luger*, Med. Klin. 1920, S. 1243. — [53]) *Luger*, Biochem. Zeitschr. **115**. — [54]) *Massart*, Bull. acad. de Belge **199**, Ser. 3, 122. — [55]) *Messerschmidt*, Zeitschr. f. Hyg. **82**. — [56]) *Meyer* u. *Gottlieb*, Exp. Pharmakologie, 2. Aufl., S. 516. — [57]) *Matsunaga*, Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. **82**. — [58]) *Nägeli*, Denkschr. d. allg. schweiz. Ges. f. Naturwissenschaften **33**. — [59]) *Nernst*, Theor. Chemie, 7. Aufl. 1913. — [60]) *Ostwald*, Grundlinien d. anorg. Chemie, 3. Aufl. 1912. — [61]) *Ostwald*, Kolloidchemie 1910, S. 206 u. 353. — [62]) *Pauli*, Verhandl. d. Naturf. 1906. — [63]) *Pauli*, Biochem. Zeitschr. **52**. — [64]) *Pauli*, ebenda **70**. — [65]) *Pauli* u. *Flecker*, ebenda **41**. — [66]) *Pfeiffer* u. *Kadletz*, Wiener klin. Wochenschr. 1917, S. 1221 u. 998. — [67]) *Pulst*, Jahrb. f. wiss. Bot. 1902, 37. — [68]) *Rieger*, Inaug.-Dissert. Breslau 1902. — [69]) *Rothmund* u. *Kornfeld*, zit. n. Nernst. — [70]) *Salus*, Wiener klin. Wochenschr. 1919, S. 1220. — [71]) *Saxl*, ebenda 1917, S. 714, 965 und 1426. — [72]) *Saxl*, ebenda 1919, S. 975. — [73]) *Saxl*, Med. Klin. 1917, S. 716, 764 und 1426. — [74]) *Saxl*, ebenda 1921. — [75]) *Schade v. d. Does*, Zeitschr. f. physiol. Chemie **24**. — [76]) *Schloßberger*, Med. Klin. 1918, Nr. 9. — [77]) *Schnabel*, Klin. Wochenschr. 1922. — [78]) *Schrauth* u. *Schoeller*, Zeitschr. f. physikal. Chemie **21**. — [79]) *Späth*, Wiener klin. Wochenschr. 1920, S. 509. — [80]) *Spiro*, Münch. med. Wochenschr. 1915, S. 1602. — [81]) *Spiro*, Biochem. Zeitschr. **74**. — [82]) *Süpfle*, Münch. med. Wochenschr. 1920, S. 1166. — [83]) *Thiele* u. *Wolf*, Arch. f. Hyg. **34**. — [84]) *True* u. *Gise*, Bull. Torr. Bot. Club. **30**. 1903. — [85]) *Weltmann*, Wiener klin. Wochenschr. 1920, S. 1068. — [86]) *Wollmann*, Wien. klin. Wochenschr. 1917, S. 1107.



(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Tübingen [Direktor: Prof. Dr. *Wolf*].)

# Beiträge zur Variabilität des Milzbrandbacillus.

Von

**Dr. G. Lutz,**

Assistent am Institut.

Mit 11 Textabbildungen.

Sollen morphologische Veränderungen an Bakterien eindeutig bestimmt werden, so muß eine Untersuchungsmethode angewandt werden, die es ermöglicht, das Wachstum der Bakterien direkt zu beobachten und diese Stellen sofort auf Glas zu fixieren, zu färben, sodaß die natürliche Lage auf dem Nährboden auch im Bilde erhalten bleibt. Es muß hierbei allerdings von der Verwendung der Ölimmersion Abstand genommen werden. Ich benutzte eine Petrischale von 7 ccm Durchmesser, auf die dünne Schicht Agar werden die Bakterien geimpft und mit dem Zeissschen F-System eingestellt. Bei der Brennweite dieses Objektives bleibt zwischen Frontlinse und Nährbodenoberfläche ein freier Raum übrig (Obj. F und Ok. 1 425 × $^1/_{12}$ Öl 450 × Vergrößerung). Um die Platte gegen Luftkeime zu schützen, wurde sie mit einer sterilisierten Tonplatte bedeckt. Durch eine zentrale Bohrung konnte der Schaft des Objektives durchgesteckt werden. Auf diese Art ist es ohne weiteres möglich, tagelang die Entwicklung der Bakterien zu beobachten. Um Vertrocknungserscheinungen zu verhüten, wurde die Tonplatte wiederholt mit sterilisiertem Wasser angefeuchtet. Bei diesem Verfahren ist es möglich, die eben beobachtete Kolonie zu fixieren und zu färben. Hierzu ist das von *Kühn-Wasielewski* angegebene Verfahren gut zu verwenden. Contractile Elemente wie Vakuolen und Protozoen können eventuell noch ihre Form verändern, doch bietet dieses Verfahren sonst die wenigsten Artefakte. Andere Fixierungsmittel als Chromessigsäure konnte ich leider nicht finden, obwohl es in manchen Fällen wünschenswert wäre, da durch das Chrom die Färbbarkeit weitgehend verändert wird. Schon die Färbung mit den gewöhnlichen Methoden ergibt schlechte Resultate; vor allem aber kann die Gramsche Färbung nicht mehr verwendet werden. Nur für die Giemsafärbung hat die Vorbehandlung mit Chromessigsäure keinen schädigenden Einfluß, wenn die Präparate zur Färbung 10—12 Stunden in den Brutschrank gebracht werden.

Das Wachstum des Milzbrandes (Mb) auf Agar und Gelatine ist im allgemeinen wohl charakterisiert. Die einzelne Kolonie stellt ein lockeres Gefüge dar, das in der Mitte eine dichte Überschichtung von Bakterien ist und sich nach der Peripherie in eine Reihe von Ausläufern, Schlingen und Fäden auflöst. Das Zustandekommen dieser typischen Koloniebilder ist durch die Grundform der Bakterien bedingt. Sie repräsentiert in diesen Bildern ein zylindrisches Gebilde mit scharfen Ecken und planen Endflächen. Dadurch bleibt bei der Vermehrung durch Querteilung eine große Berührungsfläche zwischen den neuen Individuen, und die ganze Kette erhält eine große Biegungsfestigkeit, die für das Zustandekommen dieser verwickelten Bilder eine Vorbedingung ist. Die Biegungsfestigkeit der Kette wird dadurch noch erhöht, daß die äußeren Schichten der Bakterienhülle zu einer schleimig-gallertigen Masse (Kapsel) aufquellen können. Das Zustandekommen dieser Schlingen und Biegungen läßt sich auf Grund obiger Technik stundenlang beobachten und erklärt sich aus folgenden Verhältnissen. Die Vermehrung durch Teilung ist ureigenste Lebensfunktion der Zelle. Sie wird bei den Bakterien beim Wachstum auf künstlichen Nährböden sehr bald durch den Widerstand der Unterlage beeinträchtigt. Sobald die Kraft, die beiden angrenzenden Enden auf dem Nährboden weiterzuschieben, kleiner ist als die Adhäsionswirkung auf dem Nährboden, die durch den Zusatz von Leim ziemlich groß ist, verringert sich die Möglichkeit der Teilung für die Zellen, die nicht an den Enden der Kette gelegen sind. Es entsteht eine Stauung und Spannung in der Kette, so daß sie entweder reißen muß oder wenigstens ausgebuchtet wird. Im ersteren Fall kann dann wieder ungehindertes Wachstum an den freien Enden eintreten, im anderen Falle wenigstens eine Wachstumsmöglichkeit nach dem Scheitel der Ausbuchtung. Sehr bald werden aber hier wieder dieselben Verhältnisse eintreten, die bei der hohen Biegungsfestigkeit der Mb-Kette zu einer Übereinanderlegung der beiden Schenkel und somit zum Beginn der Schleifenbildung führt. Bei diesen Beobachtungen fällt auf, daß im Verlauf der Kette sich regelmäßig Ansammlungen von Material an einem Ende der Bakterienzelle bilden. Man kann dann meist erwarten, daß dort ein weiteres Wachstum eintreten wird. Mit Beginn der Bildung der neuen Zelle verschwinden diese Ansammlungen, die sich durch starkes Lichtbrechungsvermögen kenntlich machen, und nach Ausbildung der neuen Zelle sind sie nicht mehr vorhanden, s. Abb. 1 und 2. Die Funktion als Kernsubstanz konnte für diese Erscheinungen nicht nachgewiesen werden, besonders deutlich zeigen die Enden der Ketten und die Scheitelpunkte der Schleifen, die in Teilung begriffen sind, das Entstehen und Vergehen dieser Körper. In fixiertem Zustand findet man sie nicht oft, da es den Anschein hat, daß sie sich beim Eindringen der Fixierungsflüssigkeit wieder in der Zelle verteilen. Sie stellen also keine vom übrigen Zellplasma ausdifferen-



zierten Gebilde dar, sondern sind vielmehr Anhäufungen von plastischer Substanz, die für die Bildung der neuen Zelle verwendet werden soll. Bei der Zellteilung würde demnach zuerst in der Zelle neues Material gestapelt werden. Unter Verbrauch dieser Substanz würde sich die Zelle auf die doppelte Länge vergrößern und sich dann erst zum Schluß quer teilen. Neben diesen normalen Mb-Formen treten bald in jeder Kultur Bilder auf, die nicht mehr unter die obengenannten zu rechnen sind. Sie sind meist in beschränkter Anzahl vorhanden und dadurch nicht ohne weiteres dem einhergehenden Studium zugänglich. Ändert man aber die äußeren Erscheinungen, unter denen die Bakterien wachsen, so treten diese Bilder in ungeahnter Häufigkeit auf. Zunächst benützte ich niedere Konzentration des Nährbodens und verbrachte die Kulturen nach kurzer Zeit aus 37° in Temperaturen von 10—16°. Das Ausgangsmaterial waren bald Sporen (die vegetativen Zellen wurden durch Erhitzen im Wasserbad abgetötet), teils Kulturen, die direkt aus Mb-Blut gezüchtet waren. Doch sind die nachstehenden Änderungen nicht ohne weiteres bei jedem Stamme durchzuführen; so bekam ich von einem Stück Großvieh, das an Mb gefallen war, einen neuen Stamm, der noch nicht die Fähigkeit hatte, sich den Veränderungen bei Züchtung auf künstlichen Nährböden in derselben Weise anzupassen wie die zum Teil schon lange im Laboratorium fortgezüchteten anderen Stämme.

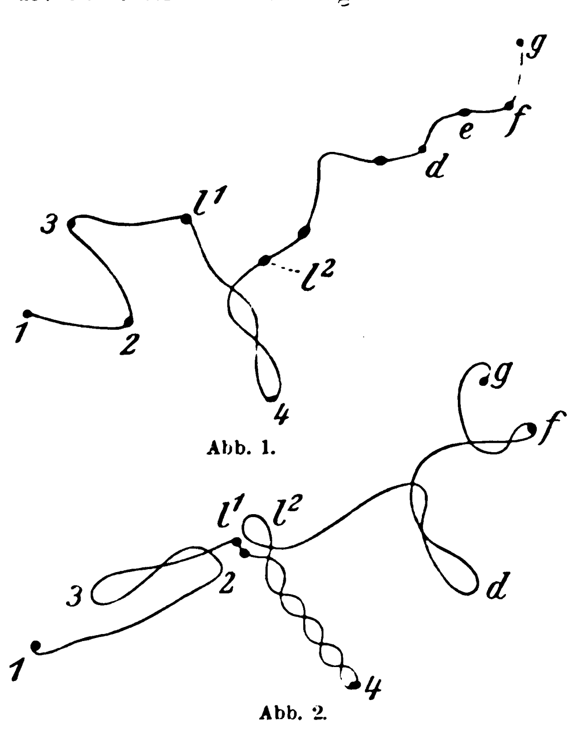
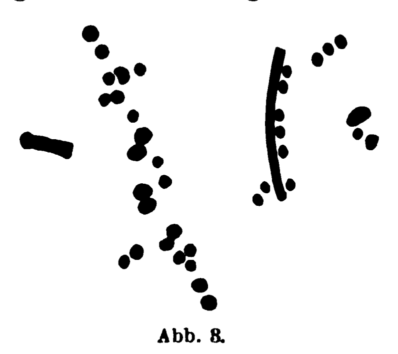


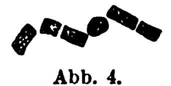
Abb. 1.

Abb. 2.

Als erstes Ergebnis ist das folgende zu erwähnen, das wegen seiner einwandfreien Versuchsbedingungen besonders wertvoll ist. Um jegliche Verunreinigung der Kultur zu vermeiden, beimpfte ich Pasteursche Kolben mit sporenreicher Milzbrandkultur, die einen Tag bei 37° auf Weizengrießagar gewachsen hatte. Nach Verschluß des Kolbens wurde die Kultur auf 80° im Wasserbad erhitzt und hier 3 Minuten gehalten (Vorversuche hatten ergeben, daß hierbei die Sporen noch nicht abgetötet wurden). Nach 24 Stunden Bebrütung bei 37° wurde der Kolben Temperaturen ausgesetzt, die stets unter 18° blieben. Es entwickelte

sich bald ein reiches Mb-Wachstum. Erst nach 14 Tagen wurde der Kolben geöffnet; die Kultur war inzwischen durchscheinend geworden, wie wenn die vegetativen Formen abgestorben wären. Die nach 14 Tagen angefertigten Präparate zeigten, daß die Form der Bakterien weitgehend verändert war. Sie waren nur wenig länger als breit und rundeten sich oft zur Kugelform vollkommen ab. Aus den Bildern war einwandfrei zu ersehen, daß diese angenommene Kugelform auch in der weiteren Vermehrung beibehalten wurde. Es hatten sich ganze Haufen dieser Kugelformen gebildet, gelegentlich lagen sie zu zweien zusammen, daneben lagen aber auch viele als einzelne kugelförmige Gebilde. Es liegt hier die direkte Umbildung der zylindrischen Form in die Kugelform vor, s. Abb. 3. Gelegentlich ist zu sehen, daß die letzten Glieder einer Kette bereits vollkommene Kugeln sind. Der Teilung der neuen Gebilde geht zunächst eine geringe Längsdehnung voraus, der dann die Querteilung folgt. Auffallend war noch das Auftreten von größeren Formen, 3—4 mal größer waren als die Bacillen. Sie waren intensiv blaurot gefärbt und ebenfalls kugelförmig. Über die Bedeutung und das Zustandekommen dieser Formen muß später berichtet werden. Eine Verwechselung der kleinen Kugelform mit Sporen kommt nicht in Frage, da diese sich nicht durch Teilung vermehren. Ich messe diesen Resultaten der Züchtung im Pasteurschen Kolben besondere Bedeutung bei, weil durch diese Versuchsbedingungen Verunreinigungen außer Frage stehen. Außer diesem Verfahren gelangte ich zu solchen Formen bei Zusatz von 0,8% Kaliumchromat zu alkalischer Bouillon; ferner traten sie bei folgendem Kulturverfahren auf. Ich verimpfte das 3—4 Wochen alte Material von Agarkulturen in Gelatine. Es wurden aus 3 verschiedenen Aufzuchten drei Serien angelegt. Die Kontrollkulturen zeigten alle Zeichen des typischen Mb-Wachstums. Zunächst entwikkelten sich sämtliche Kulturen typisch, wenngleich verzögert (diese Stämme hatten seit der letzten Isolierung aus dem Tierkörper weitgehende morphologische Veränderungen gezeigt, die später noch besprochen werden). Nach 10 Tagen wurde aus Nr. 1 jeder Serie ein Ausstrich gemacht. In allen drei Serien waren kugelige Gebilde, die zum Teil noch mit den Bacillen in Zusammenhang standen und dadurch die Entstehung dokumentierten. Der größere Teil war freiliegend, da die Kette an der Stelle der Umbildung sofort ihre Biegungsfestigkeit verliert; denn mit der Abrundung zur Kugel geht die oben beschriebene große Haftfläche verloren, und die Kette löst sich dadurch in ihre einzelnen Formelemente auf, s. Abb. 4. Im Verlauf der nächsten


Abb. 3.


Abb. 4.

Tage ging die Verflüssigung der Gelatine gleichmäßig weiter. Nach mehr als 2 Monaten wurden die Serien weiterhin untersucht. Inzwischen hatten sie wiederholt längere Zeit in Temperaturen von ca. 10° C gestanden. Es wurden nun Agarplatten mit diesem Material angelegt. Am folgenden Tage waren innerhalb der Mb-Kolonien mehrere kleine rundliche durchsichtige Kolonien aufgegangen, die größtenteils aus diesen kugelförmigen Gebilden bestanden. Doch waren auch noch vereinzelte Bacillen darunter. Diese Kolonien wurden auf neue Platten gebracht. Es entwickelte sich auch hier diese neue Form, aber schon am zweiten Tage bei Züchtung in Zimmertemperatur wurden sie fast vollständig von Mb-Bacillen über-



Abb. 5.

wuchert und verdeckt. Von den fünf angelegten Platten dieser zweiten Aussaat konnten sie nur in zweien als Kolonien bemerkt und als Reinkulturen isoliert werden. In den anderen Platten waren sie gegen das starke Mb-Bacillenwachstum nicht aufgekommen. Um eine Gewißheit zu bekommen, daß diese Kolonien, die ich auf den Platten erhalten hatte, keine Luftverunreinigungen waren, sondern die bereits in den Stammkulturen beobachteten Gebilde, mit denen sie in Aussehen und Größe vollkommen übereinstimmten, wurde zum zweiten Male die Isolierung versucht. Sie ergab dieselben Resultate in mehreren Serien. Es zeigte sich zunächst im Verlaufe des Impfstriches ein dünner zarter Rasen, der nur an einzelnen Stellen trübe Punkte von Mb-Bacillen mit ihrem



typischen Wachstum aufwies. Die Züchtung erfolgte immer bei Zimmertemperatur. Von einem solchen Impfstrich wurden neue Platten angelegt. Zwei Stunden nach der Beimpfung suchte ich den Impfstrich mittels der direkten Beobachtungsmethode ab und sah ihn voll von diesen kugelförmigen Elementen liegen. Die Platten wurden dann verschlossen bei Zimmertemperatur gehalten. Diesmal erfolgte aber nicht mehr das Wachstum von zwei Formelementen, sondern es ergaben sich nur Mb-Bacillen. Die mikroskopischen Präparate zeigten nun deutlich, wie diese Kugelform sich zu typischen Mb-Stäbchen ungewandelt hatten.

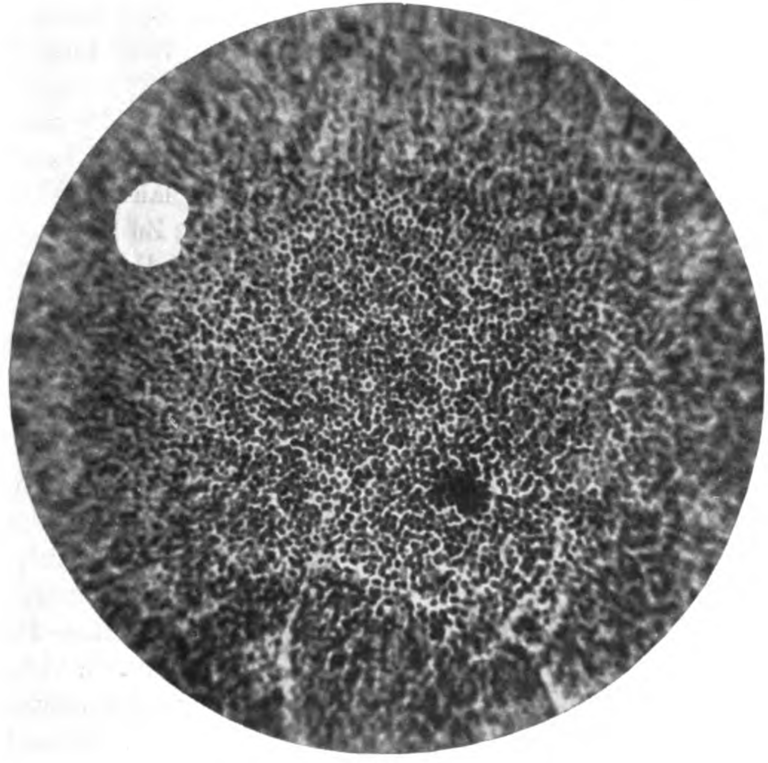


Abb. 6.

Dieser Versuch war in drei Serien zu je drei Platten angelegt, und alle zeigten dieselben Bilder (Abb. 5).

Inzwischen konnten die kugelförmigen Elemente aus der ersten Aussaat als Reinkulturen isoliert werden (Abb. 6). Bei der zweiten Aussaat war aus dem Material der ersten Serie ebenfalls eine Reinkultur gewonnen. Das Wachstum dieser Formen ist durch durchsichtige glashelle Kolonien gekennzeichnet, die in reflektiertem Licht leicht opaleszieren. Zunächst wuchsen sie nur bei ZT, erst allmählich konnten sie sich bei höheren Temperaturen entwickeln. Sie sind ferner sehr stark sauerstoffbedürftig und können unter einem Deckglas sich nicht vermehren.

Gegen Austrocknung sind sie besonders widerstandsfähig. Pathogene Eigenschaften besitzen sie nicht. Wiederholte subcutane Injektionen frischer Kulturen konnten bei weißen Mäusen keine Krankheitserscheinungen auslösen (der ursprüngliche Mb-Stamm war allerdings auch nur für Mäuse pathogen. Umsetzungen von Zuckerarten ist ihnen nicht möglich. In Lackmusmolke trat nach einigen Tagen leichte Rötung auf, die sich im Lauf der Zeit noch erheblich verstärkt. Quantitativ aber war Milchsäure nicht nachzuweisen. Neutralrot können sie nicht reduzieren. Bei Züchtung auf Endo- und Drigalski stellte sich eine merkliche Wachstumshemmung auf Endo heraus. In Bouillon bestand anfangs eine gleichmäßige Trübung, allmählich bildete sich ein starker Bodensatz und eine oben aufschwimmende dünne Schicht. Serumeiweiß und Gelatine blieben unverändert.

Bei der weittragenden Bedeutung dieser Befunde mußte nach einem Kulturverfahren gesucht werden, das diese Umbildung in rascher und zuverlässiger Weise erreichen ließ. Für Milzbrand glaube ich die geeignete Methode im folgenden Agar gefunden zu haben: Zu 1 proz. schwach alkalischem Agar mit den gewöhnlichen Zusätzen von Pepton und Kochsalz wird so viel sterilisierter Brei von rohen Kartoffeln zugesetzt, daß die gegossene Platte einen gleichmäßig undurchsichtigen grauen Farbton hat. Die Platten wurden zum Teil bei ZT, zum Teil mehrere Tage im Brutschrank gehalten. Allein dieser Temperaturunterschied bewirkte einen recht erheblichen Unterschied der Kulturen. Die Serie bei ZT wuchs wohl noch in Kettenform, aber die meisten Bakterien zeigten eine ziemlich starke kugelförmige Umbildung. Die Brutschrankserie bildete einen leicht fadenziehenden Belag, der ohne für Mb typische Kulturbilder blieb. Die Form der einzelnen Bakterien war weitgehend verändert; sie waren vielfach geknickt, die Ecken abgerundet, nur wenige Bakterien lagen in kurzen Reihen hintereinander, s. Abb. 7, sie waren verschieden lang und dick und schienen eher der Typhus-Coligruppe anzugehören. Sporenbildung war in diesen Kulturen nicht vorhanden. Diese Erscheinungen waren um so auffallender, als vor Beginn der Versuche die Reinheit des MB-Stammes geprüft war. Von diesem Material wurde auf 2proz. Schrägagar übergeimpft, die eine Serie bei ZT gehalten, die zweite nach 8 Stunden Brutschrank bei ZT weiter gezüchtet und die dritte dauernd im Brutschrank gehalten. In allen drei Serien kam nur reiner Milzbrand zum Vorschein. Der Stamm bei ZT wuchs erst nach mehreren Tagen und bildete atypische Kolonien, die beiden anderen Serien gingen zu typischem MB-Wachstum wieder zurück mit dem bekannten makroskopisch erkennbaren Wachstum. In diesen Präparaten fielen aber einzelne kugelige Gebilde auf, die in dem Stamm besonders häufig waren, der dauernd im Brutschrank gestanden hatte. Wurde aber der Stamm unter normalen Versuchsbedingungen weiter gezüchtet,

so kehrten diese Formen alle zu typischen MB-Stäbchen zurück. Die atypischen Kolonien der ZT-Serie waren in 10 Tagen zu runden, weißlich glänzenden, undurchsichtigen Kolonien mit scharfem Rand aufgegangen. Die mikroskopischen Bilder zeigten kurze dicke, nahezu kokkenförmige Gebilde. Von dieser ersten Kartoffelagarkultur (KA 37,1) wurde eine zweite Serie auf demselben Nährboden angelegt. Die Kultur ging in der gleichen Weise auf wie die erste, nur waren die Kugelformen jetzt wesentlich zahlreicher vorhanden, ferner waren auch jetzt Bilder vorhanden,

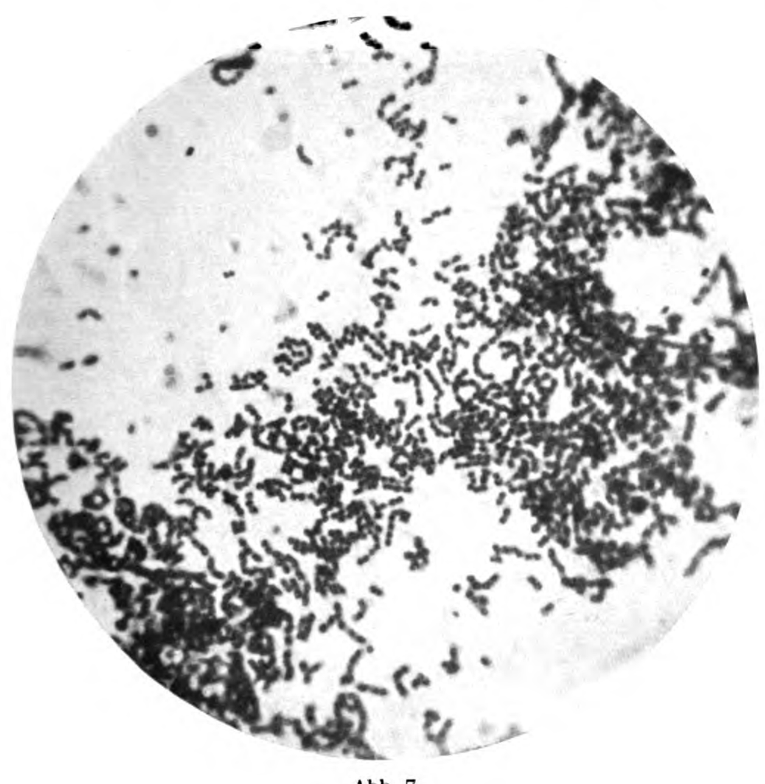


Abb. 7.

aus denen ihre Vermehrung durch Teilung hervorging. Bei Rückverimpfung dieses Materiales war es noch nicht möglich, diese Form getrennt zu isolieren. Nach ca. 6 Tagen machten sich in den Kulturen gleichzeitig an mehreren Stellen leichte Dichtigkeitsunterschiede bemerkbar. Es waren ganz diffuse Verdichtungen, die sich noch nicht über das Niveau der Umgebung erhoben und gegen die übrige MB-Kolonie nicht scharf abzugrenzen waren. Die Präparate dieser Verdichtungen ergaben diese Kugelform in größerer Anzahl. Die Überimpfung auf Schrägagar ergab zum Teil wieder ganz reine Mb-Stämme, zum Teil Mischungen dieser Kugelformen, die sich in derselben Weise weiter vermehrten, wie es in den ersten Versuchen bereits beschrieben ist. Inzwischen waren diese Verdichtun-

gen auch in einer zweiten Serie von Platten aufgetreten, die von KA 37.1 aus auf 2proz. Agar angelegt waren und im Brutschrank gestanden hatten. Hiervon wurde Material auf sterilisierte Objektträger gebracht, (wegen der geringen Mengen) ein Teil auf Schrägagar übergeimpft, der Rest als Kontrolle gefärbt. Neben den zahlreichen Kugelformen waren nur wenige MB zu finden. Im Brutschrank ging in 4 von 5 angelegten Serien zunächst eine typische MB-Kultur auf. Vom dritten Tage an standen die Kulturen bei ZT, nach weiteren zwei Tagen war zu bemerken, daß die vorher typischen haarlockenförmigen Kolonien zum Stillstand kamen, die Kulturen undurchsichtig und weißglänzend wurden. Die mikroskopische Untersuchung ergab kurze kokkenförmige gramnegative Gebilde, die sich gut vermehrten. Einzelne typische MB-Bacillen waren dazwischen noch zu finden, aber auch alle Übergänge zu den neuen Gebilden was Größe und Färbbarkeit anbelangt. Dieses Material wurde wieder auf 2proz. Schrägagar geimpft und wieder ein Teil bei ZT, ein Teil bei 37°, ein dritter nach 8 Stunden bei 37° in ZT weiter gezüchtet. In den Brutschrankkulturen traten schon nach wenigen Stunden typische Haarlockenbildungen an der Peripherie auf. Die Präparate ergaben, daß der größte Teil der kokkenförmigen Gebilde wieder zu typischen MB-Bacillen geworden war. Auch jetzt waren wieder alle Übergänge in Größe und Färbbarkeit vorhanden.

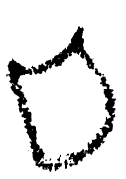


Abb. 8.

Die Mitteilungen über die Veränderungen des morphologischen Bildes des MB sollen vorläufig abgebrochen werden. Nachdem die Umwandlung einmal eingesetzt hat, können immer neue Formen auftreten, die in den früheren Kulturen meist vereinzelt im Verband mit den typischen Formen aufzufinden waren und nun bei den veränderten Bedingungen gelegentlich die überwiegende Mehrheit bilden können. Die Resultate hierüber sind noch nicht alle spruchreif. Die Erscheinungen der Umwandlungen sollen hier noch an Hand der Koloniebilder erläutert werden, die mit der Technik von *Kühn-Wasilewski* hergestellt wurden und Kolonien darstellen, die nach 2 Stunden Brutschrank in eine Umgebung von 10—18° gebracht wurden. Makroskopisch war zu sehen, daß dann alsbald das Wachstum nach der Peripherie der Kolonien sistiert wurde.

In den folgenden Tagen schien die Kolonie zusammenzusinken und durchsichtiger zu werden. Dieser Prozeß trat in der Peripherie ein und schritt zentralwärts fort. Es war besonders auffallend, daß die jüngsten Glieder, die auf unverbrauchtem Nährboden wuchsen, von der gewöhnlichen Art des Wachstums zuerst abwichen, so daß die Veränderung schon makroskopisch erkenntlich war. Die kleineren Kolonien schienen abgestorben zu sein, das periphere Wachstum war sehr gering, bei etwas stärkeren Kolonien bestand in der Mitte eine dunkle Zone, die nach außen durch einen wulstförmigen Kreis abgeschlossen war (Abb. 8). Ein eigentliches

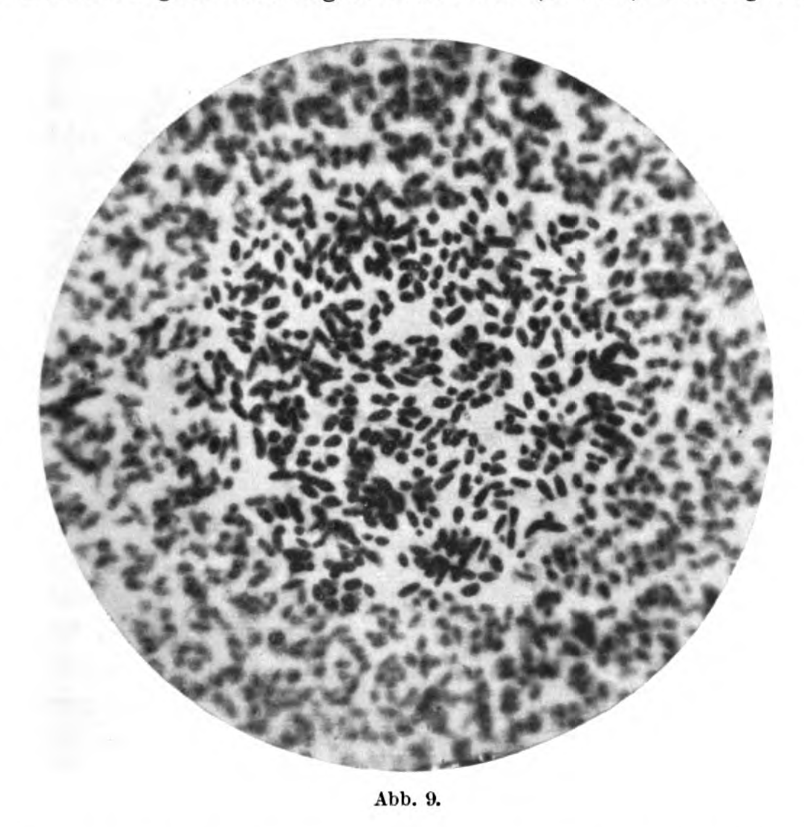


Abb. 9.

Zugrundegehen der Kolonie lag aber nicht vor, denn nach einiger Zeit begann vom Zentrum her erneutes Wachstum und bildete dicke trübe massive Kolonien. Für das Zustandekommen dieser Erscheinungen kann eine Veränderung des Nährsubstrates oder der Stoffwechselprodukte der Bakterien selbst nicht in Frage kommen, sondern es liegt hier eine Umwandlung der äußeren Form des MB vor, die in seinem Wesen selbst ihren Ursprung haben muß. Hand in Hand mit diesen makroskopischen Vorgängen gehen tiefgreifende Änderungen des mikroskopischen Bildes. Bald nach Verbringen in die niedere Temperatur bestehen besonders die neugebildeten Ketten aus kurzen Bacillen, die oft nur noch weniger lang

wie breit sind (Abb. 9). Die großen langen Ketten sind verloren gegangen. Man könnte annehmen, daß eine gesteigerte Teilungsenergie vorliegt, wodurch die Ausbildung zur vollen Größe des einzelnen Stäbchens unterbleibt; aber die vermehrte Teilung besteht nicht, denn nur langsam schreitet die Koloniebildung fort, und alle verfallen den oben beschriebenen Veränderungen. Sporenbildung unterbleibt, weil die Temperatur, die hierfür mindestens 18° C betragen soll, nicht vorhanden ist, und die wiederholten Färbungen bestätigten

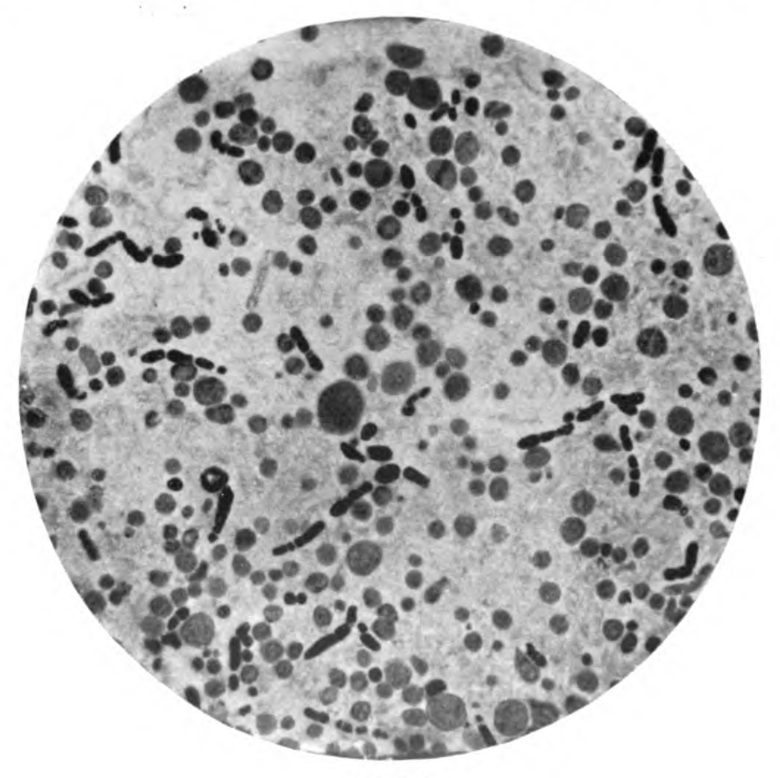


Abb. 10.

dies. Neben typischen MB-Bacillen treten nun auch hier die kleinen Kugelformen auf, wie sie in den vorhergehenden Versuchen wiederholt beschrieben worden sind.

In diesen Präparaten fallen noch Gebilde durch enorme Größe, s. Abb. 10, auf, die ebenfalls kugelrund sind und vielfach eine feine Struktur zeigen. Die Kontur ist gelegentlich gelappt, so daß sie aus mehreren kleineren Gebilden zusammengesetzt erscheinen. Es liegt sehr nahe, diese Gebilde als die Folgen osmotischer Einwirkung anzusehen. Demgegenüber ist zu erwähnen, daß bei den gewöhnlichen Versuchsbedingungen auf denselben Nährböden die gewöhnlichen typischen Bilder aus demselben Material zu erlangen waren. Ferner bildet sich oft mitten

im Verlauf einer Kette eine Zelle um, so daß nicht anzunehmen ist, daß für diese einzelne Zelle ein anderes osmotisches Gebiet besteht wie für die anschließenden. Als Absterbeerscheinung können diese Formen auch nicht betrachtet werden, da ich mit der von mir angegebenen Methode einwandfrei gesehen habe, daß auch diese große Form wieder zu typischen MB-Stäbchen sich umbilden können (Abb. 11). Enthält das Material, das zur Aussaat verwendet wird, bereits diese großen Formen, so verläuft der Prozeß viel rascher. Hierbei tritt auch die Veränderung der Färbbarkeit auf. Das reichliche Blau der Giemsafärbung tritt wesentlich zurück gegenüber einem roten Farbton. Dieser Umschlag der Färbbarkeit nach Giemsa erfolgt wohl in derselben Zeit wie die Änderung der Gramfärbung.




Abb. 11.

Nach diesen Beobachtungen wäre also festzustellen, daß die Zylinderform des MB-Bacillus in Kugelform übergehen kann, von denen die eine Art imstande ist, sich weiterhin durch Teilung zu vermehren. In dieser Phase lassen sich bis jetzt keine pathogenen Eigenschaften nachweisen. Beide Arten von Kugelformen können zu der ursprünglichen Form der Stäbchen mit allen physiologischen und biologischen Eigenschaften des MB wieder zurückgeführt werden. Als degenerative Erscheinungen können sie nicht betrachtet werden, denn sie haben eine recht intensive Lebensenergie, deren richtige Auswertung nur bei den gebräuchlichen Kulturmethoden noch nicht gelingt. Im Verlaufe von vielen Kulturserien war über die großen Kugelformen nichts Wesentliches zu finden. Sie wachsen ins Riesenhafte, und wenn sie einen gewissen Grad erreicht haben, tritt Stillstand ein. Sie können wieder zu den typischen MB zurückschlagen. Was vielleicht einen Anhaltspunkt für ihre weitere Entwicklung geben kann, sind einzelne Bilder, die ich aus Material bekam, das sehr reich an diesen Formen war und in Gelatine gestochen wurde. Nach einiger Zeit fanden sich im Innern dieser großen Formen 1—3 Körper, die in Größe und Färbbarkeit den freien kleinen Kugelformen entsprachen, die als Reinkulturen aus anderen Versuchen isoliert waren. Es liegt also der Gedanke nahe, daß diese großen riesenhaften Zellen in die kleinen kokkenförmigen Gebilde übergeführt werden können.

Betrachtet man diese Ergebnisse im Zusammenhang, so ergibt sich eine weitgehende Übereinstimmung mit den Ansichten von *Löhnis*, die er in seinem Werk „The life cycles of the Bacteria" beschrieben hat. Doch konnte ich mich bei MB nicht davon überzeugen, daß hier ein „symblastic stage" besteht, ebenso konnte ich nicht das Auftreten von Verzweigungen finden, wie sie *Lignières* und *Durrieu* (Bull. soc. centr. méd. vet. **20**, 102) und *Henri* (Cpt. rend. hebd. des séances de l'acad. des




sciences **185**, 1032) beschrieben haben. Die Arbeiten von *Henri* sind besonders zu beachten, da er durch die Einwirkung von ultravioletten Strahlen auf MB in den nachfolgenden Kulturen ebenfalls Kugel- und Kokkenformen auftreten sah. Die Riesenliteratur der früheren Jahre ist durch die eben erst erschienene Arbeit von *Löhnis* in Memoirs of the National Academy of sciences **16** zusammengestellt worden und unter dem Gesichtspunkt der Pleomorphose der Bakterien behandelt. Besonders erwähnt werden muß noch die Arbeit von *Gerhard Wagner* (Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. und Infektionskrankh., Abt. I Orig. **84**, 386, 1920), der die sog. teratologischen Formen des MB. im menschlichen Blut fand. Ferner glaube ich, daß bei den Bildern von *Reichert* (Zentalbl. f. Bakteriol., Parasitenk. und Infektionskrankh., Abt. I Orig. **87**, 118. 1921) auch die im Verlaufe meiner Arbeit beschriebenen Erscheinungen in Frage kommen. Mit den hier mitgeteilten Resultaten sind die Formen, in denen MB auftreten kann, wenn die äußeren Kulturbedingungen geändert werden, keineswegs erschöpft. Doch gilt es hier zunächst mit dem starren Dogma der Konstanz der äußeren Form zu brechen. Nach meinen Versuchen kann unter dem Einfluß der veränderten äußeren Bedingungen, die aber innerhalb der Grenzen der Wachstumsmöglichkeit liegen, die schlanke, zylindrische Form des MB allmählich verloren gehen. Zunächst treten Kugelformen auf, die wieder zu den typischen MB-Formen zurückkehren können. Durch besondere Versuchsbedingungen können diese Kugelformen derart provoziert werden, daß sie bei weitem die Übermacht über die typischen Formen erhalten. Wenn die ursprünglichen Wachstumsbedingungen wieder eintreten, die veränderten Reize der äußeren Umgebung aber lange genug eingewirkt haben, so kann sich diese kleine Kugelform stabilisieren und als solche sich wieder vermehren.

Hat man erst einmal den Komplex der Involutionsform überwunden, und sucht man zu ergründen, ob diese Kugelform (die meisten Involutionsformen werden als Kugeln oder keulenförmige Auftreibungen bezeichnet) nicht der Beginn oder das Zwischenglied einer weiteren lebensfähigen Phase in der Entwicklung der jeweiligen Bakterienart ist, so wird man sehr bald den Eindruck bekommen, daß diese Gebilde, die auf voller Höhe der Entwicklung des Stammes entstehen und wieder zu der ursprünglichen Form zurückkehren können, ebenso gut eine Zeitlang ruhen können, um dann die weiteren Phasen des Kreislaufs der Bakterien manifest zu machen. Die Bakteriologen, die mit Bodenbakterien und anderen in der Natur vorkommenden Arten arbeiten, stehen vielfach auf dem Standpunkt der Pleomorphose der Bakterien. So fand *Löhnis*, daß die nitrifizierenden Funktionen der Bakterien nicht einsetzen, wenn nur die typischen Formen der reinen Stäbchen in jungen Kulturen vorhanden sind, daß sie aber andererseits sofort einsetzten, wenn die verzweigten



Formen in den Kulturen entstanden waren. Bei Essigbakterien werden bei Temperaturen unter dem Optimum von 34° Kurzstäbchenketten gebildet, bei höheren Temperaturen wachsen sie zu langen, ungegliederten Fäden aus; letztere wieder in Temperaturen von 34° und darunter verbracht zeigen teils Zerfall in neue Kurzstäbchen, teils charakteristische Ausbauchungen; auch diese werden allmählich wieder mindestens teilweise zu Stäbchen.

Meine Untersuchungen sollen dazu beitragen, zu erweisen, daß auch bei den wohlcharakterisierten Arten der Infektionserreger durch Änderung der äußeren Bedingungen der ursprünglich pleomorphe Charakter wieder zum Vorschein kommen kann.



(Aus der Medizinischen Universitätspoliklinik in Hamburg [Direktor: Prof. Dr. *Schottmüller*].)

# Über das Auftreten und die Bedeutung von bactericiden Schutzstoffen des Blutes im Verlauf der croupösen Pneumonie.

Von

**Dr. Ernst Friedrich Müller.**

Seitdem *Buchner* an einfachen und heute noch brauchbaren Methoden die bakterientötende Kraft des strömenden Blutes nachgewiesen hatte, haben zahlreiche Autoren diese Lehre ausgebaut und mittels gleicher Versuchungsanordnungen die bactericiden Fähigkeiten der einzelnen Blutbestandteile und anderer Körperflüssigkeiten geprüft und Mittelwerte festgestellt.

Es verging dann lange Zeit, ohne daß es gelang, diese in vitro gefundenen und immunbiologisch durchaus einleuchtenden Vorgänge in bestimmte Beziehungen zu dem klinischen Krankheitsverlauf bakterieller Allgemeininfektionen zu setzen, da es eben nicht möglich war, in gleicher oder ähnlicher Weise Versuche am kranken Menschen anzustellen.

Zu neuen Zielen wurden diese Befunde erst verwandt, als *Schottmüller* die in vitro *prinzipiell gleichmäßige* Wirkung der bactericiden Kraft des menschlichen Blutes erkannte und die Kenntnis dieser Tatsache zur Differenzierung einzelner kulturell einander nahestehender Keimarten benutzte. Er führte damit eine biologisch klare Versuchsanordnung als praktisch brauchbaren Gradmesser der Bakterienfestigkeit gegenüber dieser Blutbactericidie in die bakteriologischen Untersuchungsmethoden ein.

Die Wichtigkeit dieser von *Schottmüller* eingeführten Auswertung von Keimarten, an dem Maßstab ihres Verhaltens gegenüber der Blutbactericidie ist in ihrer Bedeutung als Differenzierungsmittel mit der Notwendigkeit der Verfeinerung unserer bakteriologischen Untersuchungsmethoden noch gewachsen. Der als Virulenzversuch, vielleicht besser noch als Resistenz- oder Bactericidieversuch zu bezeichnende Vorgang ist damit eine der ersten praktisch leicht anwendbaren, biologisch eingestellten, bakteriologischen Arbeitsmethoden geworden, denn beide willkürlich miteinander in Verbindung gebrachten und



gegeneinander wirkenden Faktoren sind durchaus als mit lebendigen Eigenschaften begabt anzusehen.

Diese von *Schottmüller* zuerst zur Unterscheidung nur der Streptokokken angegebene Arbeitsmethode wurde dann auf fast alle anderen Bakterien ausgedehnt, und man kann im allgemeinen heute zusammenfassend sagen, daß die gram-positiven Keimarten der bactericiden Kraft des Blutes im allgemeinen eine verhältnismäßig große Resistenz entgegensetzen, während die gram-negativen den bactericiden Kräften des Blutes wesentlich wehrloser gegenüberstehen. Daß auch diese letzteren, wenn sie im Verhältnis zur Blutmenge enorme Zahlen erreichen, von der Blutbactericidie unbeeinflußt bleiben, ist seit langem bekannt und nach unserer ganzen Auffassung vom Krankheitsgeschehen durchaus verständlich.

Trotz dieser sicherlich exakten Befunde und trotz eines gewissen Parallelgehens dieser Versuche mit den klinisch bekannten Vorgängen der Infektionskrankheiten ist es bisher nicht gelungen, diese Reagensglasversuche in ein brauchbares Verhältnis zu dem klinischen Krankheitsverlauf zu bringen. Der erwähnte und von *Buchner* zuerst angewandte Versuch besteht grundsätzlich darin, daß man eine bestimmte Anzahl von Keimen mit etwa 6—10 ccm defibrinierten Blutes, das frisch aus der Armvene entnommen ist, zusammenbringt. Durch Entnahme von je 1 ccm dieser jedesmal gut durchgeschüttelten Mischung nach verschiedenen Zeiten und Verarbeitung zu Agarplatten ist es ohne Schwierigkeit und ebenso ohne wesentliche Fehlerquellen möglich, den jeweiligen Keimgehalt dieser Blutbakterienmischung festzustellen und aus der Zusammenstellung mehrerer zu verschiedenen Zeiten erfolgter Untersuchungen abzulesen, ob die dem Blut beigemischten Keime sich innerhalb der Versuchszeit vermehrt bzw. vermindert haben oder abgetötet werden.

Wenn dadurch auch eine Versuchsanordnung geschaffen wird, die mit den lebenden und vermehrungsfähigen Keimen arbeitet und diese zu verschiedenen Zeiten in ihrem Mengenverhältnis festhält, so besteht dieser gleiche biologische Faktor nicht in vollem Umfange auch für das aus dem Körper entnommene Patientenblut.

Man muß sich also von vornherein durchaus klar darüber sein, daß man bei einer derartigen Versuchsanordnung wohl die biologischen Eigenschaften mannigfacher Art der Keime gegen eine bactericide Wirkung auch des aus der Vene entnommenen Blutes prüfen kann. Es ist aber nicht möglich, aus einem solchen Versuch unmittelbare Rückschlüsse auf die bakterientötende Kraft des einzelnen Kranken dem untersuchten Keim gegenüber zu machen. Das liegt daran, daß die biologisch wirksamen Kräfte des Blutes in dem Augenblick ihrer Trennung vom Organismus nicht mehr neue Energien ent-



wickeln können, während der Keim voll lebens- und entwicklungsfähig bleibt.

Wir haben also in der angedeuteten Versuchsanordnung für die Bewertung der *Blutbactericidie* nur ein Momentbild aus einer einem Film zu vergleichenden Bilderreihe vor uns, während die Erregerresistenz sich grundlegend von den Verhältnissen in der Blutbahn *nicht* unterscheidet.

Man wird also, wie wir schon oben erwähnten, nur mit gewissen Einschränkungen die Wirkung der Blutbactericidie in vitro auf die natürlichen Vorgänge in der Blutbahn übertragen können, und zwar in dem Sinne, daß sie in vitro nur abgeschwächt zur Beobachtung kommen. Denn während wir wissen, daß beim Lebenden eine Vermehrung von Keimen innerhalb der Blutbahn nur unmittelbar ante exitum möglich ist, kennen wir gerade aus den Bactericidieversuchen die Fähigkeiten der meisten Keime, in vitro auch im Menschenblut sich zu vermehren. Das zeigt, daß wichtige Energien nicht in das Reagensglas übergehen.

Will man sich aber über die weitere, an sich vielleicht wichtigere Frage unterrichten, wieweit die Blutbactericidie wachsende oder fallende Werte innerhalb eines Krankheitsprozesses darstellt, so läßt sich ein solcher Einblick ohne wesentliche Schwierigkeiten dadurch gewinnen, daß man den gleichen Versuch zu verschiedenen Zeiten der Krankheit vornimmt, und man kann dann Steigen und Sinken der einer bestimmten zahlenmäßig sich gleichbleibenden Keimmenge gegenüber wirksamen bactericiden Kräfte ermitteln. Dabei kann allerdings nicht scharf genug betont werden, daß das isolierte und aus seinem Zusammenhang herausgerissene, aber praktisch nachzuprüfende Symptom der Blutbactericidie nur auf die Anwesenheit von Stoffen schließen läßt, die imstande sind, auch im Reagensglas bactericid zu wirken.

Derartige über eine gewisse Zeit ausgedehnte Prüfungen sind bisher kaum mitgeteilt worden. Nur *Bogendörfer* berichtet in letzter Zeit über drei Fälle von *Typhuskranken*, deren Stämme er zu verschiedenen Krankheitszeiten gegen ihr eigenes Blut auswertete. Er hat dabei den Hauptwert auf die Resistenz der Typhusbacillen gelegt, die nach seinen Versuchen regelmäßig abgetötet werden. Da jedoch die von ihm als Ausgangsmaterial verwandten Keimzahlen 400 niemals überschreiten, so bleibt er damit unterhalb einer in jedem Falle abtötbaren Keimzahlgrenze, und es ist daher aus seinen Versuchen eine Folgerung nicht möglich, ob die Blutbactericidie gewachsen, gefallen oder sich gleichgeblieben ist.

Dieses Beispiel zeigt bereits, wie kompliziert die Verhältnisse der Voraussetzungen für den Grundversuch werden, wenn man sich die Aufgabe stellt, mittels derartiger Reagensglasversuche einen biolo-



gischen Überblick über das Symptom der Blutbactericidie während einer Erkrankung bakteriellen Charakters zu gewinnen. Trotzdem kann der Einwand zu komplizierter Grundversuche abgelehnt werden, da diese Kompliziertheit des Grundversuchs mehr in den gedanklichen Vorüberlegungen als in der Technik gelegen ist und daher zu Fehlerquellen nicht Anlaß zu bieten braucht.

Um im weiteren Verlauf unserer Mitteilungen gleich mit praktischen Verhältnissen zu arbeiten, sollen auch diese Vorversuche an greifbaren Tatsachen angestellt werden. Wir hatten uns die Aufgabe gestellt, die Blutbactericidie und ihre Veränderung beim Ablauf der croupösen Pneumonie zu messen. Da die Pneumokokken zu den Keimen gehören, die der Blutbactericidie gegenüber für gewöhnlich resistent bleiben, war als erster Vorversuch notwendig, festzustellen, ob auch bei der geringstmöglichen Aussaat im defibrinierten, frisch entnommenen Blut noch Wachtum festzustellen ist. Diese geringstmögliche Keimzahl ist dann erreicht, wenn es gelingt, die Mischung so herzustellen, daß in 1 ccm der Blutmischung sich nur ein Keim befindet. Es ist das ohne besondere Schwierigkeit in der Weise möglich, daß man, wie es ja zu ähnlichen Versuchen geschieht, verschieden hohe Verdünnungen einer 24stündigen Serumbouillonkultur mit in der oben angegebenen Weise hergestelltem Blut vermischt. Man bekommt dann bei Mischungen von ca. 1:8 — 12 000 Verdünnungen, die bei der ersten Aussaat wirklich nur einen Keim auf einer mit 1 ccm der Blutmischung beschickten Agarplatte zeigen.

Wir konnten dann zeigen, daß auch bei solchen Verdünnungen diese einzelnen Pneumokokken gegenüber der Blutbactericidie gesunden Blutes resistent bleiben und sich vermehren. Es entstand nun die weitere Frage, ob sich das Blut der Pneumokokkenkranken anders verhielt als das Blut Gesunder, und wir haben deshalb in den weiter unten zu beschreibenden Versuchen stets mit den gleichen Pneumokokkenverdünnungen Reagensglasversuche mit dem Blut Gesunder angestellt. Da es weiterhin aus früheren Versuchen unserer Abteilung hervorgegangen war, daß zuweilen auch bei Verwendung gesunden Blutes die stets beobachtete Vermehrung der Pneumokokken mit verschiedenartiger Schnelligkeit vor sich geht, so haben wir weiterhin in einem Teil der Versuche zur Kontrolle das Blut der Kranken einmal mit dem eigenen Stamm, einmal mit einem anderen Stamm ausgewertet. Dabei zeigte sich, daß wesentliche Unterschiede in der Resistenz gegenüber der Blutbactericidie zwischen frischen, aus Sputum oder Blut gezüchteten Pneumokokkenstämmen und älteren Laboratoriumsstämmen nicht bestanden.

Wir lassen später die einzelnen Versuche ohne besondere Erklärung folgen, möchten ihnen aber noch folgendes vorausschicken.

Die Aufgabe bestand darin, die Blutbactericidie im Verlauf einer croupösen Pneumonie zu prüfen. Es war also notwendig, bei den einzelnen Kranken an mehreren Tagen Blut zu entnehmen und mit dem eigenen und anderen Stämmen gegenüber gesundem Blut zu prüfen, letzteres, um, wie oben erwähnt, Fehlerquellen aus Zufälligkeiten des Einzelversuchs auszuschließen. Wir haben das an unseren Fällen in der Weise gemacht, daß wir bei den Patienten sofort bei der Aufnahme, dann — wenn möglich — am Tage vor der Krisis und schließlich in der Rekonvaleszenz innerhalb der ersten 14 Tage nach dem Fieberabfall Blut entnommen haben und das in der oben angegebenen Weise mit den von uns für notwendig erachteten Kontrollen über 24 Stunden prüften. Eine längere Prüfung haben wir nur in den Fällen vorgenommen, bei denen entweder eine Vermehrung ins Unendliche nach 24 Stunden noch nicht zu beobachten war, oder bei denen eine Abtötung eine längere Kontrollierung der Blutmischung notwendig erscheinen ließ.

Bei der Technik des Bactericidieversuchs sind noch verschiedene praktisch wichtige Dinge zu berücksichtigen. Es ist z. B. nicht gleichgültig, wie lange das aus der Armvene entnommene und unmittelbar darauf defibrinierte Blut aufbewahrt wird, bis der Versuch beginnt, und das weist auch wieder auf die schon zu Anfang gemachte Überlegung hin, daß man mit jedem derartigen Bactericidieversuch nur einen Moment aus der biologischen Wirkung des Blutes fixieren kann, weil sich aus unseren Versuchen zeigt, daß eine gewisse Zeit nach der Entnahme das Blut die Fähigkeit der Bactericidie verliert.

Weiterhin erscheint es uns wichtig, folgende Beobachtung eines klinisch mehrfach nachgeprüften Bactericidieversuchs mitzuteilen, bei dem es sich um eine Pneumokokken-Endokarditis handelte, und bei dem mehrfach folgendes Phänomen beobachtet worden ist.

Bei der Patientin waren zuerst zahlreiche Keime im Blut nachweisbar, und anläßlich des ersten Bactericidieversuchs wurde folgendes beobachtet: Das aus der Armvene entnommene Blut, das sofort zu Platten verarbeitet wurde, enthielt sehr reichlich Pneumokokken. Wurde das gleiche Blut nach der Entnahme aus der Armvene zuerst durch 10 Minuten langes Schütteln mit Glasperlen in der sterilen Glasflasche defibriniert, und dann, zeitlich also nur 10 Minuten später, von dem nun defibrinierten Blut gleiche Mengen zu Platten verarbeitet, so zeigte sich, daß nur noch ganz vereinzelte Keime vorhanden waren. Die gleiche Verminderung nach dem Schütteln zeigte sich, als die Versuche wiederholt wurden. Es läßt sich daraus nicht erkennen, woran die Verminderung bzw. Abtötung der Keime gelegen hat, besonders da sicherlich angenommen werden muß, daß eine Steigerung der absoluten Menge der bactericiden Kräfte im Reagensglas nicht mehr



vor sich gehen kann. Möglich wäre dagegen, daß auf eine uns noch unbekannte Weise durch den Vorgang der Defibrinierung bakterientötende Kräfte frei geworden sind, deren Effekt an der Keimverminderung abzulesen ist. Eine Nachprüfung dieser Bakterienverminderung wurde in dem Sinne vorgenommen, daß wir zu dem sterilen Blut eines Gesunden Pneumokokken hinzusetzten und nach der rasch vorgenommenen Mischung sofort eine Agarplatte gossen, dann nach der Defibrinierung eine weitere gleiche Menge zu Agarplatten verarbeiteten. Dabei zeigte sich, daß eine geringe Verminderung der Keime ebenfalls vor sich gegangen war. Diese Verminderung war jedoch wesentlich geringer als bei dem Blut des Falles mit Pneumokokken-Endokarditis. Dort beobachteten wir, daß die Keimzahlen von 400 und 1100 auf 20 und 8 im ccm heruntergingen, während bei Mischungen von gesundem Blut mit Pneumokokken die Herabsetzung der Keime nur etwa 20 % des Anfangswertes betrug, gegenüber fast 95 % des ersten Falles.

Diese Tatsache wird später noch eingehender zu würdigen sein. An dieser Stelle ist nur darauf hinzuweisen, daß dieses Phänomen nicht als Fehlerquelle betrachtet werden darf, sondern vorerst nur als solches verwertet werden muß. Eine eigentliche Fehlerquelle ist es aus dem Grunde nicht, weil es nur durch Defibrinierung möglich ist, überhaupt in dem angegebenen Sinne mit Blut zu arbeiten, und weil, wie wir gesehen haben, es nicht darauf ankommt, fürs erste die absolut gleichen Verhältnisse des Organismus in den Versuch hinüberzunehmen, sondern vielmehr darauf, eine unter gleichen Voraussetzungen gewonnene defibrinierte Blutmenge als Testobjekt gegenüber bestimmten Keimen zu verwenden.

Untersuchungen des übriggebliebenen Blutgerinnsels ergaben sowohl bei dem ersterwähnten Fall mit Pneumokokken-Endokarditis als auch bei der künstlichen Kontrolle keine Anreicherung der Keime in dem Fibringerinnsel. Diese Untersuchung war deshalb notwendig, um dem Einwand begegnen zu können, daß die nach der Defibrinierung fehlenden Keime in dem Fibringerinnsel enthalten sein könnten. Es läßt sich durch Zermörserung dieses Gerinnsels und Ausgießen in Platten leicht die darin befindliche Keimzahl nachprüfen, die allerdings auf die Menge und den Rauminhalt des Fibringerinnsels (Ausgangsblutmenge vermindert um die Menge des flüssigen defibrinierten Blutes) bezogen werden muß.

Weiterhin erschien es uns wichtig, festzustellen, ob diese sich sonst gleichbleibende Bactericidie durch Aufbewahrung des Blutes verloren geht, und wir haben deshalb in mehreren Fällen Untersuchungen angestellt, indem wir zuerst mit dem frisch entnommenen und defibrinierten Blut den oben beschriebenen Bactericidieversuch ansetzten

und über 24 Stunden fortführten. Wir haben dann das übrigbleibende Blut in der gleichen Flasche im Eisschrank aufbewahrt und immer nach 24 Stunden ca. 8—10 ccm entnommen und mit diesem den gleichen Versuch angesetzt, über 24 Stunden durchgeführt und konnten dabei feststellen, daß die bactericide Kraft des Blutes in den ersten 4—6 Tagen nicht wesentlich abnimmt. Weniger deutlich war das bei gesundem Blut gegenüber Pneumokokken, weil in diesem Falle die Bactericidie überhaupt gering ist und eine Abnahme nur an sehr exakt mit gleichen Verdünnungen angesetzten Versuchen festzustellen wäre. Da aber solche Versuche von vornherein nur sehr grobe Schlußfolgerungen zulassen, können die daraus gewonnenen Resultate nicht sicher verwertet werden. Anders ist es dagegen bei derartigen Versuchen mit dem Blut von Pneumoniekranken, von dem wir später noch genauer zeigen werden, daß die Bakterien wesentlich deutlicher gehemmt, bzw. abgetötet werden. Bei diesen tritt der Verlust dieser bakterienhemmenden bzw. -abtötenden Kräfte deutlich zutage, wenn man in der angegebenen Weise mit dem gleichen Blut die Versuche täglich wiederholt.

Wir teilen das so ausführlich mit, nicht nur, weil durch ein zu langes Aufbewahren Fehlerquellen in den Bactericidieversuch hineingetragen werden können, sondern weil umgekehrt diese Befunde darauf hinweisen, daß bei dem Blut Pneumokokkenkranker ein Mehr an bactericider Energie vorhanden sein muß, was nunmehr nicht nur aus dem positiven Ereignis der Wachstumshemmung zu beweisen ist, sondern nun auch an dem Verlust dieser Eigenschaft im umgekehrten Sinne erhärtet werden kann. Praktisch für den Bactericidieversuch ist vielleicht noch von Wichtigkeit, nicht nur mit *einer* Bakterienaufschwemmung zu arbeiten, weil man leicht zu hohe Keimzahlen bereits in die Ausgangsblutmischung hineinbekommen kann. Man kann dann Verhältnisse bekommen, die durch ihre Menge bereits der Bactericidie gegenüber eine gewisse Bakterienresistenz bedingen und dadurch die bactericide Eigenschaft des Blutes überdecken.

Neben der früheren *Schottmüller*schen Methode, die darin bestand, daß man zuerst eine Öse der zu benutzenden Bakterienaufschwemmung ausstrich, färbte und auszählte und so die Keimzahl der Ausgangsaufschwemmung kannte, haben wir jetzt mit gutem Erfolg den Versuch in der Weise angestellt, daß wir eine 24stündige Bouillon- oder Serumbouillonkultur in fallenden Verdünnungen mit Blut zusammengebracht haben. Man bekommt durch ein derartiges Nebeneinanderstehen einer Ausgangsverdünnung z. B. von 200 und einer von 10 Bakterien im cmm ein genaueres Bild über die bactericide Kraft gegenüber einer größeren und einer geringeren Keimmenge, und man kann besonders dann über eine sichere Resistenz der Bakterienart gegen-



über der Blutbactericidie aussagen, wenn man mit einem Ausgangsmaterial von einem Keim im Kubikzentimeter den Versuch beginnt. Denn nur dann kann man daraus eine absolute Resistenz der Blutbactericidie gegenüber erkennen.

Wir lassen nunmehr die einzelnen Fälle mit ihren tabellarisch wiedergegebenen Ergebnissen der Baktericidieversuche folgen.

*Fall 1.* L., 15jähriger Bote, mit Pneumonie des linken Unterlappens sowie des rechten Ober- und Unterlappens, kommt am 2. Tage der Pneumonie zur Behandlung. Kritischer Abfall der Temperatur am 7. Tage, komplikationsloser Verlauf. Pneumokokken aus Blut und Sputum gezüchtet.

*Bactericidieversuch, 2. Krankheitstag:*

| | Blut L. *Eigenstamm* | Blut L. *Eigenstamm* | Blut gesund *Stamm L.* | Blut gesund *Lab.-Stamm* | Blut L. *Lab.-Stamm* |
|---|---|---|---|---|---|
| Sofort | 420 | 22 | 270 | 32 | 49 |
| 2 Std. | 180 | 14 | 420 | 107 | 3 |
| 5 „ | 28 | 12 | 680 | 520 | 17 |
| 7 „ | 42 | 26 | 1200 | 1400 | 112 |
| 10 „ | 280 | 312 | 3800 | 3900 | 682 |
| 24 „ | 1800 | 2500 | 18000 | 21000 | 1400 |
| 48 „ | ca. 16000 | ca. 16000 | — | — | — |

*Bactericidieversuch, 7. Krankheitstag:*

| | Blut L. *Eigenstamm* | Blut L. *Eigenstamm* | Blut gesund *Stamm L.* |
|---|---|---|---|
| Sofort | 360 | 18 | 250 |
| 2 Std. | 210 | 16 | 480 |
| 4 „ | 36 | 12 | 930 |
| 8 „ | 96 | 22 | 1700 |
| 10 „ | 325 | 31 | 6200 |
| 24 „ | 11160 | 960 | ca. 14000 |
| 48 „ | ca. 18000 | ca. 15000 | — |

*Bactericidieversuch, 24. Krankheitstag:*

| | | | |
|---|---|---|---|
| Sofort | 530 | 48 | 620 |
| 2 Std. | 200 | 6 | 490 |
| 5 „ | 70 | 18 | 1200 |
| 8 „ | 56 | 12 | 3600 |
| 11 „ | 340 | 22 | 8200 |
| 24 „ | 1800 | 630 | ca. 22000 |
| 48 „ | ca. 25000 | ca. 9800 | — |

*Zusammenfassung*: Keimhemmung ist am 2. Tag gegenüber dem gesunden deutlich vermehrt, die gleiche Keimhemmung, ohne eine weitere Steigerung, besteht am 7. Krankheitstag sowie in der Rekonvaleszenz.

*Fall 2.* K., 32jähriger Arbeiter, Pneumonie beider Unterlappen, kommt am 5. Tag in Behandlung, am gleichen Tag kritischer Temperaturabfall auf 38°, am 9. Krankheitstag fieberfrei, komplikationsloser Verlauf.





*Bactericidieversuch, 5. Krankheitstag:*

| | Blut K. *Eigenstamm* | Blut K. *Eigenstamm* | Blut gesund *Stamm K.* |
|---|---|---|---|
| Sofort | 420 | 5 | 220 |
| 2 Std. | 230 | 9 | 310 |
| 4 „ | 280 | 2 | 540 |
| 9 „ | 1100 | 110 | 1600 |
| 25 „ | über 10000 | 3800 | über 10000 |

*Bactericidieversuch, 20. Krankheitstag:*

| | | | |
|---|---|---|---|
| Sofort | 360 | 12 | 37 |
| 2 Std. | 240 | 2 | 180 |
| 4 „ | 145 | 8 | 160 |
| 7 „ | 710 | 96 | 810 |
| 10 „ | 1140 | 290 | 2100 |
| 24 „ | über 10000 | 8200 | über 10000 |

*Zusammenfassung:* Geringe Keimhemmung gegenüber dem gesunden, am 5. Krankheitstag keine Vermehrung der Keimhemmung.

*Fall 3.* Fr., 44 jähriger Händler, Pneumonie des linken Unterlappens, am 6. Krankheitstag in Behandlung, kritischer Temperaturabfall am 8. Krankheitstag, seitdem fieberfrei, komplikationsloser Verlauf. Pneumokokken aus Sputum gezüchtet, Blut negativ.

*Bactericidieversuch, 6. Krankheitstag:*

| | Blut Fr. *Eigenstamm* | Blut Fr. *Eigenstamm* | Stamm Fr. *Stamm Fr.* |
|---|---|---|---|
| Sofort | 460 | 5 | 540 |
| 2 Std. | 240 | 1 | 710 |
| 4 „ | 36 | 0 | 668 |
| 6 Std. | 146 | 0 | 1400 |
| 8 „ | 350 | 0 | 3500 |
| 10 „ | 1100 | 0 | 8000 |
| 24 „ | über 10000 | 0 | über 10000 |

*Bactericidieversuch, 20. Krankheitstag:*

| | | | |
|---|---|---|---|
| Sofort | 510 | 37 | 280 |
| 2 Std. | 68 | 52 | 560 |
| 4 „ | 122 | 19 | 1180 |
| 6 „ | 240 | 187 | 3000 |
| 8 „ | 128 | 322 | 7000 |
| 10 „ | 360 | 520 | über 10000 |
| 24 „ | 1100 | 2800 | — |
| 36 „ | 1800 | — | — |

*Zusammenfassung:* Deutliche Wachstumshemmung gegenüber dem gesunden am 6. Krankheitstag, keine wesentliche Vermehrung der Wachstumshemmung am 20. Krankheitstag.

*Fall 4.* H., 57 jähriger Gärtner, Pneumonie des rechten Oberlappens, kommt am 4. Krankheitstag in Behandlung, lytischer Temperaturabfall, vom 11. Krankheitstag ab fieberfrei. Aus Blut und Sputum Pneumokokken gezüchtet.



*Bactericidieversuch, 4. Krankheitstag:*

| | Blut H. *Eigenstamm* | Blut H. *Eigenstamm* | Blut gesund *Stamm H.* |
|---|---|---|---|
| Sofort | 400 | 225 | 156 |
| 2 Std. | 360 | 98 | 360 |
| 4 „ | 38 | 108 | 385 |
| 8 „ | 120 | 57 | 1100 |
| 10 „ | 410 | 560 | 2800 |
| 24 „ | 2500 | 4000 | 7800 |

*Bactericidieversuch, 17. Krankheitstag:*

| | | | |
|---|---|---|---|
| Sofort | 1420 | 168 | 118 |
| 2 Std. | 3500 | 78 | 240 |
| 4 „ | über 10000 | 121 | 286 |
| | | 320 | 590 |
| | | 1080 | 2200 |
| | | 2900 | über 10000 |

*Zusammenfassung:* Wachstumshemmung gegenüber dem gesunden am 4. Tag deutlich, am 17. Krankheitstag noch vorhanden, aber bereits geringer als während der Fieberperiode.

*Fall 5.* W., 54 jähriger Küfer, Pneumonie des rechten Unterlappens, am 4. Krankheitstag in Behandlung, am 8. Krankheitstag lytischer Temperaturabfall, vom 13. Krankheitstag ab fieberfrei. Komplikationsloser Verlauf, Pneumokokken aus dem Blut und Sputum gezüchtet.

*Bactericidieversuch am 4. Krankheitstag* (Blut 24 Stunden nach der Entnahme):

| | Blut W. *Eigenstamm* | Blut W. *Eigenstamm* | Blut gesund *Stamm W.* |
|---|---|---|---|
| Sofort | 260 | 17 | 46 |
| 2 Std. | 220 | 12 | 56 |
| 4 „ | 180 | 56 | 188 |
| 6 „ | 340 | 65 | 600 |
| 8 „ | 520 | 322 | 920 |
| 10 „ | 1620 | 1100 | 1900 |
| 24 „ | 8500 | über 10000 | über 10000 |

*2. Bactericidieversuch, 16. Krankheitstag:*

| | Blut W. *Eigenstamm* | Blut W. *Eigenstamm* | Blut gesund *Stamm W.* | Blut gesund *Stamm W.* |
|---|---|---|---|---|
| Sofort | 320 | 160 | 420 | 38 |
| 2 Std. | 18 | 96 | 500 | 94 |
| 4 „ | 84 | 80 | 1200 | 620 |
| 6 „ | 160 | 192 | 2200 | 1400 |
| 8 „ | 640 | 368 | 3200 | 3100 |
| 10 „ | 2100 | 1800 | 7000 | 9000 |
| 24 „ | über 10000 | über 10000 | über 10000 | über 10000 |

*Zusammenfassung:* Deutliche Keimhemmung in den ersten Stunden gegenüber dem gesunden, keine wesentliche Vermehrung der bactericiden Kräfte in der Rekonvaleszenz.

*Fall 6.* Pi., 35jähriger Kutscher, kommt etwa am 15. Krankheitstage mit geringer Dämpfung über dem rechten Unterlappen nach anscheinend abgelaufener Pneumonie in Behandlung. Später stellt sich ein Empyem heraus, aus dem Pneumokokken in Reinkultur gezüchtet werden. Operation. Normaler Heilverlauf.

Stamm Pi. wird als *Kontrolle* gemeinsam mit dem nächsten Fall untersucht.

*Fall 7.* Z., 17jähriger Arbeiter, kommt am 4. Krankheitstage mit linksseitiger Unterlappenpneumonie in Behandlung, am 9. Krankheitstag kritischer Temperaturabfall, vom 10. Krankheitstage an fieberfrei. Pneumokokken aus Sputum und Blut gezüchtet.

Stamm Pi. und Stamm Z. werden neben den bisher beschriebenen Bactericidieversuchen mit dem Eigenblut zu gleicher Zeit als Kontrollen mit dem Blut jedesmal des anderen ausgewertet.

Bei diesem Versuch stammt das *Blut Pi.* (*Empyem*) vom 52. *Krankheitstage* (Empyem noch nicht operiert), das *Blut Z.* vom 4. *Krankheitstage.*

*Bactericidieversuch:*

| | Blut Pi. *Eigenstamm* | Blut Pi. *Eigenstamm* | Blut Pi. *Stamm Z.* | Blut Pi. *Stamm Z.* | Blut gesund *Stamm Pi.* | Blut gesund *Stamm Z.* | Blut Z. *Eigenstamm* | Blut Z. *Eigenstamm* | Blut Z. *Stamm Pi.* | Blut Z. *Stamm Pi.* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Sofort | 780 | 6 | 1600 | 4 | 820 | 640 | 380 | 32 | 840 | 136 |
| 2 Std. | 1120 | 65 | 1100 | 0 | 1200 | 510 | 120 | 8 | 9 | 24 |
| 4 „ | 2800 | 156 | 520 | 0 | 4000 | 2200 | 580 | 124 | 326 | 320 |
| 9 „ | 3600 | 168 | 48 | 0 | 8200 | 10000 | 1160 | 1480 | 1840 | 1680 |
| 25 „ | 8200 | | 1420 | | | | 14000 | ca. 18000 | 16000 | 16000 |

*2. Bactericidieversuch Z., 12. Krankheitstag:*
2 Tage nach Abfieberung

| | Blut Z. *Stamm Pi.* | Blut Z. *Stamm Pi.* |
|---|---|---|
| Sofort | 56 | 6 |
| 2 Std. | 32 | 0 |
| 4 „ | 64 | 4 |
| 6 „ | 156 | 0 |
| 15 „ | 1050 | 0 |
| 18 „ | 1800 | 0 |
| 24 „ | 7800 | 0 |

*Zusammenfassung*: Blut Pi. (Empyem) hemmt den eigenen Stamm kaum, dagegen stärker den fremden, während der Stamm P. vom gesunden Blut ebenfalls nicht gehemmt wird. Blut Z. (Pneumonie) hemmt den eigenen Stamm in gleicher Weise wie den fremden stärker als gesundes Blut. Im späteren Krankheitsstadium tritt keine Vermehrung der Bactericidie des Blutes Z. auf.

Daß demnach bei länger bestehender Erkrankung der Stamm eine gewisse Resistenz der Blutbactericidie gegenüber erreicht, wäre in gewissem Sinne verständlich. Wenn auch eine derartige Resistenzvermehrung eines Pneumokokkenstammes niemals auf Grund eines einzigen solchen Versuchs behauptet werden darf, zeigt der Versuch einwandfrei, daß auch bei länger bestehender Antigenwirkung keine wesentliche Vermehrung der Blutbactericidie, sondern eher eine Abschwächung eintritt.

Der Fall Pi. (Empyem) verlief auffallend günstig, so daß diese Bactericidieverminderung prognostisch nicht ungünstig angesehen werden darf.



*Fall 8.* Sch., 52jährige Frau, am 8. Krankheitstage mit Pneumonie des linken Oberlappens aufgenommen. Continua um 38°, am 9. Krankheitstage. Exitus letalis. Pneumokokken aus dem Sputum gezüchtet.

*1. Bactericidieversuch, 8. Krankheitstag:*

| | Blut Sch. *Stamm Pi.* | Blut gesund *Stamm Pi.* |
|---|---|---|
| Sofort | 360 | 510 |
| 2 Std. | 180 | 212 |
| 4 „ | 16 | 618 |
| 6 „ | 0 | 2100 |
| 8 „ | 0 | 3000 |
| 10 „ | 0 | ca. 8000 |

*Zusammenfassung:* Deutliche Keimhemmung bis zur Abtötung eines fremden Stammes. (Kontrolle am nächsten Tage; Blut Sch. 24 Stunden im Eisschrank aufbewahrt.)

*2. Bactericidieversuch* (Kontrolle), *8. Krankheitstag:*

| | Blut Sch. *Stamm Pi.* | Blut Sch. *Stamm L.* |
|---|---|---|
| Sofort | 1400 | 1100 |
| 2 Std. | 720 | 860 |
| 4 „ | 350 | 550 |
| 6 „ | 100 | 620 |
| 8 „ | 270 | 890 |
| 10 „ | 210 | 235 |
| 24 „ | 4 | 260 |
| 48 „ | 0 | 800 |
| 72 „ | 0 | 4800 |

Abtötung eines fremden Stammes, auffallend langdauernde Keimhemmung eines 2. fremden Stammes.

*Fall 9.* R., 63jähriger Wächter, rechtsseitige Oberlappenpneumonie, am 3. Tag in Behandlung gekommen, am gleichen Tag Exitus letalis. Pneumokokken aus Lunge und Knochenmark gezüchtet. *Bactericidieversuch* ergibt bei Ausgang von 410 Keimen im Kubikzentimeter gegenüber gesundem Blut deutliche Wachstumshemmung bis zu 6 Stunden, bei Ausgang von 2 Keimen Abtötung nach 2 Stunden.

*Fall 10.* Br., 31jähriger Werftarbeiter, Pneumonie beider Unterlappen, am 2. Krankheitstage in Behandlung gekommen, unter dauernd hohem Fieber, Exitus am 7. Krankheitstage.

Pneumokokken am 2. Krankheitstage aus Blut und Sputum sowie aus dem Wirbelmark gezüchtet.

*Bactericidieversuch* ergibt am *2. Krankheitstage* bei Aussaat von 3 Keimen im Kubikzentimeter keine Wachstumshemmung, bei Aussaat von 240 Keimen im Kubikzentimeter geringe Wachstumshemmung gegenüber Normalblut bis zur 7. Stunde.

*Bactericidieversuch am 6. Krankheitstage* (20 Stunden ad exitum) ergibt ebenfalls geringe Wachstumshemmung bei Aussaat von 68 Keimen im Kubikzentimeter.

*Fall 11.* von P., 36jähriger Tapezierer, am 8. Krankheitstage mit Pneumonie des rechten Unterlappens aufgenommen, am 10. Krankheitstag lytischer Temperaturabfall, vom 12. Krankheitstag ab fieberfrei. Komplikationsloser Verlauf. Pneumokokken nicht gezüchtet.







*1. Bactericidieversuch am 8. Krankheitstage* mit Laboratoriumsstamm ergibt geringe Wachstumshemmung bis zur 4. Stunde gegenüber dem Normalblut, bei Aussaat bis zu 400 Keimen im Kubikzentimeter.

*2. Bactericidieversuch am 24. Krankheitstage* mit Laboratoriumsstamm zeigt geringe Wachstumshemmung bis zur 6. Stunde, doch gibt auch Normalblut bei der Kontrolle bis zur 4. Stunde Wachstumshemmung.

*Fall 12.* V., 19 jähriger Kaufmann, Pneumonie des rechten Unterlappens, kommt am 3. Krankheitstag in Behandlung, am 8. Krankheitstag lytischer Temperaturabfall, vom 10. Krankheitstag ab fieberfrei. Komplikationsloser Verlauf. Pneumokokken aus dem Sputum gezüchtet.

*Bactericidieversuche am 4. und 14. Krankheitstage* ergeben geringe Wachstumshemmung gegenüber dem gesunden bis zur 6. bzw. 8. Stunde.

*Fall 13.* St., 32 jähriger Seemann, mit Pneumonie des rechten Unterlappens, am 3. Krankheitstag in Behandlung. Kritischer Temperaturabfall am 7. Krankheitstag. Komplikationsloser Verlauf.

*Bactericidieversuch am 6. Krankheitstag* mit fremdem und Sputumstamm ergibt bei Aussaat von über 400 Keimen im Kubikzentimeter keine Wachstumshemmung, bei Aussaat von 88 bzw. 22 Keimen im Kubikzentimeter, sowohl dem eigenen Stamm wie dem fremden Stamm gegenüber, Wachstumshemmung bis zur 6. bzw. 8. Stunde.

*Fall 14.* B., 37 jähriger Arbeiter, kommt mit Pneumonie der ganzen rechten Lunge, schwerem Ikterus und delirierend in Behandlung. Continua um 39° Exitus am 13. Krankheitstage. Pneumokokken aus Blut, Sputum, Lunge und Wirbelmark gezüchtet. Bactericidieversuch am 9. Krankheitstage zeigt bei Aussaat vom 310 Keimen keine erkennbare Hemmung gegenüber der Kontrolle, bei Aussaat von 32 Keimen im Kubikzentimeter Hemmung des Keimwachstums bis zur 4. Stunde.

*Fall 15.* Schr., 27 jähriger Tapezierer, kommt mit Pneumonie des linken Unterlappens am 3. Krankheitstage in Behandlung. Lytischer Temperaturabfall am 8. Krankheitstage. Vom 10. Krankheitstage an fieberfrei. Bis auf eine Thrombose der linken Vena femoralis komplikationsloser Krankheitsverlauf.

Bactericidieversuche am 4., 8. und 36. Krankheitstage zeigen deutliche Hemmung des Keimwachstums bis zur 6. bzw. 8. Stunde bei fehlender Keimhemmung der Kontrollen.

Aus diesen tabellarisch mitgeteilten Untersuchungsergebnissen geht Mannigfaches hervor. Am wichtigsten erscheinen uns zwei Tatsachen: Mit Ausnahme dreier Fälle ist auch das Blut der Pneumoniekranken zum mindesten in vitro nicht imstande, eine Abtötung der Pneumokokken zu erreichen. Diese konnten sich vielmehr in fast allen Fällen auch im Blute der Pneumoniekranken vermehren. Als zweite Tatsache fällt bereits bei dem oberflächlichen Überblick über die mitgeteilten Tabellen auf, daß eine deutliche Verschiedenheit zwischen dem Verlauf der Vermehrung bei dem gesunden Blut und dem der Pneumoniekranken besteht. Dieser Unterschied zeigt sich ganz deutlich darin, daß bei dem Blut der Pneumoniekranken durchweg eine Verzögerung in der Keimvermehrung sichtbar wird, die sich teilweise bis in die achte und zehnte Stunde hinzieht. Bei anderen Fällen kommt es entschieden zur Abtötung eines großen Teiles der eingesäten Keime,



denn nicht anders kann man es sich erklären, wenn die zuerst bei der Einsaat vorhandene Keimzahl bei den Entnahmen der gleichen Menge des Blutgemisches sich später vermindert hat. Auch der Einwurf, daß durch die Einsaat ein Teil der Keime lebensunfähig geworden ist und nun bei den späteren Entnahmen aus der Blutmischung nicht mehr nachgewiesen werden kann, ist aus unseren Untersuchungen abzulehnen. Es zeigt sich nämlich bei einigen Fällen, daß die Verminderung der Keimzahlen, die entschieden auf eine Abtötung zurückgeführt werden muß, nicht sofort einsetzt, sondern daß auch zwischen den Entnahmen der zweiten, vierten und sechsten Stunde Unterschiede bestehen, und zwar zeigt sich bei einzelnen Fällen, daß in der zweiten Stunde fast die gleiche Keimmenge in der Blutmischung enthalten ist wie bei der Einsaat, während erst in den nun folgenden Entnahmen eine Verminderung auftritt. Gegenüber diesen Tatsachen erschien uns von besonderem Interesse die als Kontrolluntersuchungen gleichzeitig angestellten Bactericidieversuche mit gesundem Blut, bei denen man in den meisten Fällen eine fast gerade ansteigende Kurve der Pneumokokkenvermehrung feststellen kann.

Nach der bereits beschriebenen Verminderung bzw. Hemmung der Keimvermehrung in der zweiten bis achten Stunde zeigt auch das Blut der Pneumoniekranken dann eine fast ebenso schnelle Vermehrung der Keime wie das gesunde Blut. Aus diesen beiden Tatsachen kann einwandfrei geschlossen werden, daß die bactericide Kraft des Blutes der Pneumoniekranken gegenüber dem gesunden Blut wesentlich erhöht ist, und zwar bewirkt diese Erhöhung eine teilweise Abtötung der eingesäten Keime. Nach den zu Anfang gemachten Darlegungen muß man daran denken, daß grundlegende Unterschiede zwischen dem Versuch in vitro und den natürlichen Verhältnissen liegen, und es ist in jedem Falle die Folgerung berechtigt, daß die im Reagensglas beobachtete bakterientötende Kraft unter natürlichen Verhältnissen deshalb größer sein wird, weil durch die dauernde Neubildung der Blutbestandteile und durch ihren Zusammenhang mit dem Organismus die bakterientötende Fähigkeit deutlicher in Erscheinung treten kann.

Wichtiger als die bereits bekannte Tatsache stärkerer Alexine im Blute bakteriell infizierter Individuen war die Frage, wie sich innerhalb des Verlaufs einer bakteriellen Erkrankung die Werte der bactericiden Schutzstoffe verhalten, und deshalb hatten wir uns bei unseren Untersuchungen die Aufgabe gestellt, nachzuprüfen, ob innerhalb des Verlaufs einer Pneumonie eine Vermehrung der bactericiden Schutzstoffe anzunehmen sei. Nach den mitgeteilten Untersuchungen ist die Möglichkeit einer solchen Feststellung durchaus gegeben, weil es ja bei einer derartigen Fragestellung nicht notwendig ist, absolut gleiche Verhältnisse, wie sie im Körper vorliegen, im Reagensglas zu schaffen, sondern



weil es für die Beantwortung dieser Frage allein darauf ankommt, ob die im Reagensglas in einwandfreier Weise meßbaren bactericiden Kräfte im Verlauf einer Pneumonie wachsen oder nicht.

Nach unseren Untersuchungen ist das nicht der Fall. Unsere Tabellen zeigen, daß die am zweiten Tage der Pneumonie vorhandenen bactericiden Kräfte allerdings dem gesunden Blut gegenüber eine wesentlich höhere Wertigkeit aufweisen. Diese höhere Wertigkeit bleibt aber in den meisten Fällen bis zum Ablauf der fieberhaften Periode und bis in die Rekonvaleszenz hinein bestehen, ohne dann noch zu steigen. Im einzelnen läßt sich aus den mitgeteilten Ergebnissen ersehen, daß das an mehreren Tagen im Verlauf einer Pneumonie entnommene Blut etwa die gleichen Werte der Bactericidie aufweist. und daß diese dem normalen Blut gegenüber erhöhte Fähigkeit der Keimhemmung noch eine Zeitlang in der Rekonvaleszenz nachzuweisen ist. In einem Falle konnte diese Erhöhung der bactericiden Kräfte noch nach völliger Abheilung etwa acht Wochen nach Beginn der Erkrankung nachgewiesen werden.

Wir müssen daher die zu Anfang aufgestellte Frage, ob innerhalb des Ablaufs einer Pneumonieerkrankung ein wesentliches Steigen der bactericiden Schutzstoffe festzustellen ist, mit den nun vorliegenden Untersuchungsergebnissen neu formulieren. Unsere Untersuchungen zeigen, daß eine wesentliche Steigerung innerhalb der Pneumonieerkrankung nicht in dem Sinne vorhanden ist, daß etwa die bactericiden Schutzstoffe sich immer weiter vermehren, bis eines Tages ein Überwiegen derselben über die Bakterienresistenz nun einer Heilung parallel ginge. Es zeigt sich vielmehr, daß sofort in den ersten Tagen der Pneumonie die bactericiden Schutzstoffe dem gesunden Blut gegenüber deutlich erhöht sind, während im weiteren Verlauf der Erkrankung diese Erhöhung wohl absolut bestehen bleibt, aber an sich nicht mehr wächst. Die zuerst aufgestellte Frage ist damit experimentell beantwortet, aber sie ist sicherlich nicht die einzige, deren Lösung aus den mitgeteilten Untersuchungsbefunden hervorgeht, und es ergibt sich bereits aus den eben besprochenen Tatsachen die weitere Frage, in welches Stadium der Krankheit diese Vermehrung der bactericiden Schutzstoffe zu verlegen ist. Auch dies läßt sich nunmehr dahin beantworten. daß diese Steigerung der bactericiden Kräfte vor dem zweiten Krankheitstage liegen muß, also höchstwahrscheinlich mit ihrem Beginn bereits in das Prodromalstadium fällt und im Blut schon zu einer Zeit auftritt, in der nachweisbare Krankheitserscheinungen noch nicht vorliegen.

Wir werden weiterhin die Annahme für berechtigt ansehen müssen, daß diese bactericiden Schutzstoffe innerhalb des gesamten Krankheitsablaufs und Heilvorganges eine Rolle spielen, daß jedoch diese Rolle

nur eine verhältnismäßig untergeordnete ist, d. h. über den Charakter einer Teilfunktion nicht hinausgeht. Wir folgern das daraus, daß diese Schutzstoffe am zweiten Krankheitstage ihre Höhe bereits erreicht haben, ohne daß die Krankheit beendet ist, daß weiterhin diese Schutzstoffe nicht dazu ausreichen, die Keime in wesentlichen Mengen abzutöten, und daß trotzdem die Erkrankung in den meisten Fällen günstig abläuft.

Wir kommen damit auf das Gebiet der natürlichen Heilung der Pneumonie und wollen zum Schluß unserer Ausführungen insoweit diesen Vorgängen nähertreten, als es unmittelbare Folgerungen aus unseren Untersuchungsresultaten gestatten.

Wir hatten bei der Beantwortung unserer ersten Frage, inwieweit eine Steigerung der bactericiden Schutzstoffe bei der Pneumonie der klinischen Heilung parallel geht, d. h. inwieweit diese Schutzstoffe an der Heilung unmittelbar beteiligt sind, gesehen, daß ein solches Parallelgehen nicht vorliegt. Danach müssen wir nunmehr die weitere Folgerung aus unseren Befunden ziehen und annehmen, daß die zur Pneumonieheilung führenden *Vorgänge* in der Hauptsache nicht innerhalb der Blutbahn zu suchen sind, sondern erst am Krankheitsherd in Erscheinung treten. Dafür spricht einerseits die Tatsache, daß die Erreger der Pneumonie sich während des größten Teils des Krankheitsablaufs überhaupt nicht dauernd in der Blutbahn befinden, denn ihr Nachweis gelingt klinisch meist nur in den ersten Krankheitstagen. Weiter hatten wir gesehen, daß die Bactericidie des strömenden Blutes einer Heilung der örtlichen Pneumokokkeninfektion in der Lunge nicht parallel geht, denn diese örtliche Infektion heilt in den meisten Fällen ab, ohne daß, wie wir zeigen konnten, die Abwehrstoffe des Blutes zu einer völligen Abtötung der Keime ausgereicht hätten. Aus diesen Beobachtungen kann nur gefolgert werden, daß die Zellimmunität und ihre Kräfte bei der Pneumonieheilung der Blutimmunität bzw. der Säfteimmunität wesentlich überlegen und für den Heilungsvorgang von überragender Wichtigkeit sind. Dabei ist allerdings unberücksichtigt geblieben, ob diese Zellimmunität den örtlichen Gewebszellen oder den Leukocyten eigen ist. Doch kann im Rahmen dieser Ausführungen nicht auf diese allerdings wesentliche, aber hier zu weit führende Frage näher eingegangen werden, wenn auch die bekannten Bilder der pathologisch-anatomischen Vorgänge im Lungengewebe wie innerhalb der Blutbildungsstätten den weißen Blutzellen eine sicherlich führende Bedeutung zuweisen. Es wäre theoretisch durchaus mit unseren Befunden in Einklang zu bringen, daß diese Zellen an Blut oder Gewebe bactericide Stoffe abgeben können, und daß diese die in unseren Versuchen meßbare Bactericidie darstellen. Doch müssen derartige Überlegungen vorerst ins Gebiet der Theorie verwiesen und



nur in diesem Sinne beurteilt werden. Nicht berührt wird davon die durchaus einleuchtende, überragende Wichtigkeit der örtlichen Heilungsvorgänge gegenüber den in der Blutbahn vor sich gehenden, wenn auch ihre zentrale Bildung und Abstammung nach dem Gesagten durchaus wahrscheinlich wird.

Noch eine letzte Frage scheint uns erwähnenswert, die gewisse Beziehungen zu unseren Untersuchungsergebnissen besitzt, und die uns gerade von unserem Standpunkt der Pneumonieheilung aus wichtig erscheint: Das ist die Behandlung der Pneumonie mit *spezifischem Serum*. Diese Behandlung mit Serum soll darauf beruhen, vorgebildete Abwehrstoffe dem Organismus zuzuführen, und wir können wohl, ohne auf nähere Einzelheiten einzugehen, auch aus unseren Untersuchungsresultaten folgern, daß keineswegs durch eine Zuführung einer derartig spezifisch wirkenden Substanz in die Säfte des Körpers die Möglichkeit besteht, heilend auf die Pneumonie zu wirken. Denn einerseits kamen in den hier mitgeteilten Fällen die Pneumonien in einem großen Prozentsatz der Fälle zur komplikationslosen Ausheilung. ohne daß, mit Ausnahme eines Falles, der letal verlief, z. B. die bactericiden Kräfte des Serums zur völligen Abtötung größerer Keimmengen genügt hätten. Das beweist, daß sie allein zur Heilung nicht ausreichen. Und daraus muß unserer Ansicht nach zweierlei geschlossen werden: Einmal besteht nicht die Möglichkeit, durch Behandlung mit Pneumokokken im Blut so starke Schutzstoffe zu erzeugen, daß dieselben imstande sind, Pneumokokken in größeren Mengen abzutöten (vgl. Fall 6), und weiter geht aus unseren Befunden hervor, daß Pneumonien in der Mehrzahl der Fälle heilen, ohne daß im Blut Pneumokokken abtötende Stoffe nachweisbar werden. Wir müssen deshalb folgern, daß solche mit dem Pneumokokkenserum zugefügte Schutzstoffe zur Pneumonieheilung nicht ausreichen, und daß in den Fällen, in denen nach Serumgaben günstige Beeinflussungen der Pneumonien beobachtet worden sind, diese günstigen Beeinflussungen aus anderen Ursachen, unter denen auch an unspezifische Eiweißwirkung zu denken wäre, zustande gekommen sind. Es ist dafür besonders bezeichnend der von uns mitgeteilte Fall 8, der zum Exitus kam, und in dessen Blut eine derartige Steigerung der bactericiden Schutzstoffe vorhanden war, daß selbst größere Mengen von Pneumokokken völlig abgetötet wurden. Die im einzelnen mitgeteilten Kontrollen stellen sicher, daß es sich in diesem Falle nicht um einen zufälligen Untersuchungsfehler handelte.

Es sei noch eine kurze Bemerkung gestattet im Anschluß an Beobachtungen von *Neufeld* und *Haendel* aus dem Jahre 1909[1]) über serologisch verschiedene Pneumokokkenarten. An diese Beobachtungen

[1]) *Neufeld* und *Haendel*, Berl. klin. Wochenschr. 1912, S. 680.



von serologisch zu unterscheidenden Pneumokokkenarten wird neuerdings wieder von amerikanischen Autoren die Folgerung geknüpft, man müsse bei der Serumbehandlung der Pneumonie in jedem Falle den Versuch machen, ein Serum in Anwendung zu bringen, das gegen die Art des Erregers eingestellt ist, der in dem zu behandelnden Falle die Pneumonie bedingt hat. Wir möchten mit den Folgerungen aus unseren Untersuchungen nicht zu weit gehen, können aber nicht umhin, gerade in diesem Zusammenhang darauf hinzuweisen, daß ja unsere Untersuchungen erkennen lassen, daß ein grundlegender Unterschied in der Wirkung des Serums gegen den eigenen Stamm und gegen andere Stämme nicht besteht, und möchten deshalb zum mindesten die Folgerung einer so komplizierten Serumbehandlung aus den Befunden der vier verschiedenen Pneumokokkenarten als noch nicht durchaus bewiesen ansehen.

Die von uns mitgeteilten Untersuchungsergebnisse haben zusammenfassend gezeigt, daß bei der Pneumonie sofort mit dem klinischen Einsetzen der Erkrankung, spätestens am zweiten Krankheitstage, die auch im normalen Blut vorhandenen bactericiden Schutzstoffe gegenüber Pneumokokken stärker in Erscheinung treten als beim Gesunden und in einzelnen Fällen befähigt sind, auch größere Mengen von Pneumokokken abzutöten.

Eine weitere wesentliche Steigerung über die Werte des zweiten Krankheitstages findet im Verlauf der Pneumonie nicht mehr statt. Es muß deshalb gefolgert werden, daß die bactericiden Schutzstoffe nur einen Teil der körperlichen Abwehr darstellen, denen gegenüber nicht in der Blutbahn vor sich gehende Prozesse für die Heilung wichtiger sind.

---





(Aus dem Württembergischen Medizinischen Landesuntersuchungsamt.)

# Einfluß der Typhusschutzimpfung auf Erkrankungs- und Sterblichkeitsziffer, Länge der Inkubationszeit und Eintritt der höchstmöglichen Schutzwirkung.

Von

Dr. **W. Huwald**,

stellv. Vorstand.

Die Wirkung der Typhusschutzimpfung läßt sich nur dann einwandfrei beurteilen, wenn folgende Bedingungen vorliegen: eine gemeinsame, gleichzeitige und annähernd gleichstarke Infizierung einer größeren Anzahl von Menschen und dabei die Möglichkeit der vergleichenden Beobachtung von Geimpften und Ungeimpften. Bei der im Tübinger Wilhelmsstift (Internat für katholische Theologiestudierende) im Jahre 1920 ausgebrochenen Typhusepidemie sind diese Bedingungen, abgesehen von dem kleinen Umfang der Epidemie, in weitgehendem Maße erfüllt.

Es handelt sich um eine von der gemeinsamen Küche ausgehende Nahrungsmittelepidemie von 46 Erkrankungen[1]) und acht Todesfällen. Da Entstehung und Verlauf dieser Epidemie bereits in Veröffentlichungen von *Schmidt*[2]) und von *Lutz*[3]) beschrieben wurden, kann ich mich hierüber kurz fassen. Die Typhusbacillen waren mit größter Wahrscheinlichkeit durch die Küchenschwester, die sich später als chronische periodische Typhusbacillenausscheiderin erwies, in die Speisen gelangt. Der Verlauf der Epidemie geht aus Tabelle I hervor. Diese zeigt auch, daß die Mehrzahl der Erkrankungen (27) vor, die Minderzahl (19) nach der Impfung (29. Novemver) auftrat.

Die 152 Zöglinge waren in vier Jahrgänge eingeteilt, deren jeder einen großen gemeinsamen Schlafsaal hatte; nur der vierte Jahrgang wohnte zum Teil außerhalb des Stiftes in der Stadt. Die Beköstigung

---

[1]) Einschließlich der auf Urlaub und der während der Beobachtung in auswärtigen Krankenhäusern Erkrankten.

[2]) *O. Schmidt*, Zeitschr. f. Medizinalbeamte 1922, Nr. 1.

[3]) *Lutz*, Med. Korrespondenzbl. f. Württemberg 1921, Nr. 32 und 34. — *Lutz*, Zentralbl. f. Bakt. I. O. 87, Nr. 7/8, S. 486.



erhielten alle, auch die in der Stadt wohnenden Studenten, ebenso wie die sieben Repetenten (Lehrer) gemeinsam aus der Stiftsküche. Da sich die Erkrankungen bei Ausbruch der Epidemie (— später nicht mehr —) fast ausschließlich auf die beiden jüngsten Jahrgänge beschränkten, während die älteren und vor allem die in der Stadt wohnenden anfangs ganz verschont blieben, entstand besonders unter den Zöglingen die irrige Auffassung, daß es sich um eine örtliche Begrenzung der Epidemie und demnach wohl auch um eine in den örtlichen Verhältnissen liegende Ursache handeln müßte. Von sachverständiger Seite wurde dagegen von Anfang an betont, daß bei der ungleichen Verteilung der Erkrankungen das Ausschlaggebende in der Verschiedenheit des Impfschutzes lag, da die ältesten Jahrgänge bereits im Feld mehrfach und außerdem auch noch im Jahre 1919 im Stift anläßlich einer kleinen Hausepidemie gegen Typhus geimpft worden waren.

*Tabelle I.*

| Datum | Erkrankungszugänge |
|---|---|
| November 1920 | |
| 13. | ● |
| 14. | ● |
| 15. | ◐ ◐ |
| 16. | |
| 17. | ◐ |
| 18. | |
| 19. | ◐ |
| 20. | |
| 21. | ● ● ◐ |
| 22. | ◐ ◐ |
| 23. | ● ● ● ◐ ◐ |
| 24. | ● |
| 25. | ● ● ◐ |
| 26. | ● ● |
| 27. | ● ◐ |
| 28. | ● |
| 29. (Impfung 1.) | ↗● ● ○ |
| 30. | ↗○ ↗○ |
| Dezember 1920 | |
| 1. | ↗● |
| 2. (Impfung 2.) | ↗● ↗◐ ↗◐ ↗◐ ↗○ |
| 3. | ↗● |
| 4. | ↗○ ↗● |
| 5. (Impfung 3.) | |
| 6. | ↗◐ ↗◐ ↗◐ |
| 7. | ↗○ ↗○ |
| 8. | |
| 9. | |
| 10. | |
| 11. | |
| 12. | |
| 13. | |
| 14. | |
| 15. | ↗◐ ↗○ |

Impfung {1. 2. 3.} Einspritzung

Die Kreise bedeuten die Erkrankungszugänge.

● = zu Beginn der Epidemie ungeimpft.
◐ = zu Beginn der Epidemie 1—2 mal geimpft.
○ = zu Beginn der Epidemie 3- und mehrmal geimpft.
↗ = während der Epidemie (29. Nov.) geimpft.

*Einfluß der Schutzimpfung auf Prozentsterbe- und -erkrankungsziffer.*

Berücksichtigt man im einzelnen Fall nur die Gesamtzahl, nicht die Zeit der Impfungen, so erhält man das in den Tabellen IIa und IIb wiedergegebene Bild:

*Tabelle II a.*

| Geimpft | Personen | Erkrankt | Gestorben |
|---|---|---|---|
| 0 mal | 35 | 20 = 54,2% | 5 |
| 1 mal | 24 | 11 = 45,8% | 0 |
| 2 mal | 36 | 6 = 16,7% | 3 |
| 3 mal | 21 | 4 = 19% | 0 |
| 4 mal | 19 | 3 = 15,5% | 0 |
| 5- und mehrmal | 15 | 2 = 13,3% | 0 |

*Tabelle II b.*

| Geimpft | Personen | Erkrankt | Gestorben |
|---|---|---|---|
| 0 mal | 15 | 15 = 100% | 5 |
| 1 mal | 27 | 11 = 40,7% | 0 |
| 2 mal | 23 | 9 = 39,1% | 2 |
| 3 mal | 32 | 3 = 9,4% | 1 |
| 4 mal | 22 | 4 = 18,2% | 0 |
| 5 mal | 16 | 2 = 12,5% | 0 |
| 6- und mehrmal | 15 | 2 = 13,3% | 0 |

Es soll bei dieser Abhandlung unterschieden werden zwischen „Impfungen“ und „Einspritzung“. Die übliche dreimalige Einspritzung bei der ersten Impfung, die zweimalige bei der zweiten und die einmalige bei den folgenden wird je als eine Impfung gerechnet. Die während der Epidemie vorgenommene Impfung ist bei Tabelle IIa nicht berücksichtigt, bei Tabelle IIb mit eingerechnet. Nicht mit aufgeführt sind die neun Studenten, die bereits früher Typhus durchgemacht hatten. Das richtigere Bild gibt, wie die späteren Ausführungen zeigen werden, die Tabelle IIa.

Diese Zahlen zeigen in eindringlicher Weise, daß sich die Seuche die Personen mit geringstem oder fehlendem Impfschutz geradezu ausgesucht hat. Diese Tatsache drängt zu dem Schluß, daß bei dieser Epidemie der Infektionsstoff so gleichmäßig und allgemein verteilt war, als dies überhaupt bei einer Nahrungsmittelepidemie möglich ist. Da es sich ferner durchweg um Personen des jüngeren Mannesalters und um weitgehende Gleichheit der Lebensbedingungen gehandelt hat, sind wir berechtigt, dem vorliegenden Zahlenmaterial trotz seiner verhältnismäßigen Kleinheit besondere Beweiskraft zuzuerkennen.

Daraus, daß die Erkrankungsziffer bei den zwei- und mehrmal Geimpften erheblich geringer ist als bei den einmal Geimpften und bei diesen wieder erheblich geringer als bei den Ungeimpften, geht zweifelsfrei hervor, *daß durch die wiederholte Schutzimpfung die Erkrankungszahl herabgesetzt wurde.* Ebenso deutlich ist — was ja auch die Erfahrungen des Weltkrieges gelehrt haben — *die günstige Beeinflussung der proz. Sterbeziffer*: Von den 35 zu Beginn der Epidemie noch nie Geimpften starben 5 = 14,3 % oder auf die Erkrankungszahl (20) der

Anmerkung: Die diesen Untersuchungen zugrunde gelegten Statistiken wurden auf Grund der von den Beteiligten handschriftlich ausgefüllten Fragebogen aufgestellt. Die Zahlen unterscheiden sich in einigen, jedoch nicht wesentlichen Punkten von den in den *Lutz*schen Veröffentlichungen angegebenen.



anfangs Ungeimpften berechnet 25 %. Die Sterblichkeit war also — soviel läßt sich jedenfalls aus den kleinen Zahlen schließen — bei den Personen, die zur Zeit der Ansteckung noch keinerlei Impfschutz besaßen, außergewöhnlich hoch. Von den 60 1—2 mal Geimpften starben 3 = 5 %, also bereits erheblich weniger, und die 55 drei- und mehrmal Geimpften hatten überhaupt keinen Todesfall mehr.

*Bei einer Epidemie mit einer an sich hohen Sterblichkeit hatte also die drei- und mehrmalige Impfung dieselbe Wirkung bezüglich der Sterblichkeit wie das frühere Überstehen eines Typhus abdominalis.*

Berücksichtigt man außer der Zahl der Impfungen auch den zeitlichen Abstand der letzten Impfung, so ergibt sich zunächst, daß nur einer von den 8 an Typhus Gestorbenen im Jahre 1920 (während der Epidemie) geimpft worden war:

2 (im ganzen je zweimal) zuletzt 1919 geimpft,
1 (im ganzen dreimal) zuletzt 1920 geimpft,
5 überhaupt nicht geimpft.

Man gewinnt daraus den Eindruck, daß die während der Epidemie, genauer ausgedrückt, während der Inkubationszeit ausgeführte Impfung einen günstigen Einfluß auf die Prozentsterbeziffer gehabt hat. Ein bestimmter Schluß kann natürlich bei der kleinen Zahl von Todesfällen (8) nicht gezogen werden.

Bezüglich der Prozenterkrankungszahl erhalten wir folgendes Bild:

*Tabelle III.*

| Geimpft | Personen | Erkrankt |
|---|---|---|
| Nur 1920 während der Epidemie | 20 | 5 = 25% |
| Außer 1920 auch schon 1918 (jedoch nicht 1919) | 19 | 5 = 26,3% |
| Außer 1920 auch schon 1919 | 65 | 8 = 12.3% |

Diejenigen, die außer 1920 auch schon 1919 geimpft worden waren, sind also wesentlich besser gestellt hinsichtlich der Erkrankungszahl als die (durchschnittlich im ganzen ebensooft geimpften) Personen, die 1919 nicht geimpft worden waren. *Die Impfung von* 1919 *hatte also* — soweit aus den kleinen Zahlen Schlüsse gezogen werden können — *noch nach Jahresfrist eine günstige Einwirkung auf die Erkrankungsziffer.*

Warum die nur im Jahre 1920 Geimpften (Tab. III, Querspalte 1) nicht, wie zunächst erwartet werden könnte, eine wesentlich höhere Prozenterkrankungsziffer hatten als die mehrmals Geimpften (in Querspalte 2), ergibt sich aus der später noch im einzelnen zu besprechenden Tatsache, daß die zu Beginn der Epidemie Ungeimpften in größerem Prozentsatz schon vor der Impfung vom 29. XI. erkrankten als die mehrmals Geimpften.

Von größter praktischer Bedeutung ist natürlich die Frage, ob die



im Jahre 1920 während der Epidemie vollzogene Impfung noch in den Verlauf eingreifen konnte.

Da im November 1920, mit Ausnahme von sechs Studenten, alle, die nicht bereits erkrankt waren oder schon früher einen Typhus durchgemacht hatten, durchgeimpft wurden, so fehlt nach dem 29. XI. die wichtigste Grundlage für die Beurteilung, der Vergleich zwischen Geimpften und Ungeimpften. Immerhin könnte man dieser Frage auf anderem Wege näher kommen.

Wenn nämlich die Impfung 1920 einen Einfluß auf die Erkrankungszahl hatte, so mußte sich dieser Einfluß bei den anfangs überhaupt nicht Geimpften in stärkerem Maße geltend machen als bei den bereits Geimpften. Ein derartiger Unterschied ist auch tatsächlich vorhanden.

Zu Beginn der Epidemie waren 35 Personen noch nie geimpft, davon erkrankten vor der Impfung 15 = 42,9 %. Die noch nicht erkrankten 20 wurden am 29. XI. geimpft, und von diesen erkrankten noch 5 = 25 %. Vergleicht man damit das Schicksal der 115 Personen, die zu Beginn der Epidemie bereits ein- oder mehrmals geimpft waren, so ergibt sich bei gleicher Berechnungsart für die Zeit vor der Impfung eine Erkrankungszahl von 12 = 10,4 %, nach der Impfung von 14 = 14,4 %[1]). Demnach hat die Prozenterkrankungsziffer nach der Impfung vom 29. XI.

bei den zu Beginn der Epidemie Ungeimpften um 17,9% abgenommen,
bei den zu Beginn der Epidemie bereits ein- oder mehrmals Geimpften um 4% zugenommen,
bei der Gesamtzahl der Studenten und Repetenten um 1,8% abgenommen.

Die Prozenterkrankungsziffer hat also bei denen, die zu Beginn der Epidemie noch nicht geimpft waren, nach der Impfung 1920 nicht nur im ganzen, sondern auch im Verhältnis zur Gesamterkrankungsziffer ganz erheblich abgenommen.

Ist das aber tatsächlich eine Folge der Impfung 1920? Es gibt hierfür auch noch eine andere Erklärung. Man wird voraussetzen dürfen, daß bei einer Nahrungsmittelepidemie von den Menschen, die im wesentlichen die gleiche Menge Infektionsstoff in sich aufgenommen haben, ceteris paribus diejenigen zuerst erkranken, die den aufgenommenen Infektionskeimen am wenigsten Schutzstoffe entgegenwerfen können. Das sind aber, wie auch die Tafel IIa zeigt, eben die Ungeimpften. Es ist also zum mindesten auch die Auffassung möglich, daß die Prozenterkrankungsziffer der anfangs Ungeimpften nach dem 29. XI. (Tag der ersten Einspritzung) nicht deshalb so stark abnahm, weil sie an diesem Tag geimpft worden waren, sondern weil fast alle

[1]) Von den zu Beginn der Epidemie bereits Geimpften waren am 29. November nach Abzug der Erkrankten noch 103 übrig, von denen aber noch die 6, die am 29. November nicht geimpft wurden, abgezogen werden müssen.



Ungeimpften, deren natürliche Schutzstoffe über die eingedrungenen Typhusbacillen nicht Herr wurden, infolge ihrer kürzeren Inkubationszeit bereits erkrankt waren, als geimpft wurde. Die Frage, *ob die während der Epidemie, also während der Inkubationszeit vorgenommene Impfung nicht nur die Sterblichkeit, sondern auch die Erkrankungszahl herabdrücken konnte, läßt sich also auf Grund des vorliegenden Materials weder bejahen noch verneinen.*

*Einfluß der Schutzimpfung auf die Länge der Inkubationszeit.*

Mit den letzten Ausführungen ist auch bereits die Frage nach der Länge der Inkubationszeit angeschnitten. Nach vielfacher Erfahrung kann die Inkubationszeit des Typhus abdominalis ausnahmsweise einen Spielraum von 6—45 Tagen haben. Es gibt also auch ohne Schutzimpfung große Unterschiede in der Länge der Inkubationszeit, entsprechend der individuellen Widerstandsfähigkeit und entsprechend der Menge der aufgenommenen Infektionskeime. Läßt sich nun bei der Stiftsepidemie beweisen, daß die Schutzimpfung die Länge der Inkubationszeit beeinflußt hat? Wenn eine derartige Wirkung vorhanden war, mußte sie am deutlichsten erkennbar sein, wenn man bei den am wenigsten (oder gar nicht) Geimpften feststellt, wie viele von ihnen *vor* und wie viele *nach* der Impfung (vom 29. XI.) erkrankten, und diese beiden Zahlen in das Verhältnis setzt zu der Gesamtzahl der Erkrankten vor und nach der Impfung. Da es nach dem 29. XI. keine Ungeimpften mehr, sondern nur mindestens einmal Geimpfte gab, muß man aus rechnerischen Gründen den Ungeimpften vor der Impfung (29. XI.) die einmal Geimpften nach der Impfung gegenüberstellen, ebenso den einmal Geimpften vor die zweimal Geimpften nach der Impfung usw. Es ergibt sich bei dieser Berechnung, bei der die während der Epidemie vorgenommene Impfung behandelt wird, wie wenn sie überhaupt keine Wirkung gehabt hätte, folgendes Bild:

*Tabelle IV.*

| Vor der Impfung | | Nach der Impfung vom 29. November | |
|---|---|---|---|
| Gesamtzahl der Erkrankungen 27 | darunter | Gesamtzahl der Erkrankungen 19 | darunter |
| | 0 mal geimpft 15=55,6% | | jetzt 1 mal geimpft 5=26,3% |
| | 1—2 „ „ 10=37% | | „ 2—3 „ „ 7=36,8% |
| | 3- u. mehrmal „ 2=7,4% | | „ 4- u. mehrmal „ 7=36,8% |

Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Gesamtzahl der Erkrankungen vor und nach der Impfung und sollen den Grad der Zu- bzw. Abnahme der Erkrankungsziffer bei jeder der drei Impfungsgruppen zeigen.

Es läßt sich also in überzeugender Weise zeigen, daß die nicht Geimpften in größerem Prozentsatz früher erkrankten als die Geimpften. Der Unterschied ist so groß, daß er nicht durch Zufall erklärt werden kann, obwohl ja das Zahlenmaterial sehr klein ist. *Tatsächlich muß*





*also bei den Geimpften eine Verzögerung der Erkrankung, eine Verlängerung der Inkubationszeit eingetreten sein.* Gegen diese Beweisführung ließe sich einwenden, daß die Inkubationszeiten überhaupt nicht aus den Erkrankungstagen berechnet oder abgeschätzt werden könnten, da ein Teil der Erkrankungen gar nicht auf die gemeinsame Nahrungsmittelinfektion, sondern auf späte rerfolgte Kontaktinfektionen zurückgeführt werden müßten, aber abgesehen davon, daß durch die sofortige Überführung der Krankheitsverdächtigen in die Medizinische Universitätsklinik die Kontaktmöglichkeit nahezu ausgeschlossen war, waren ja gerade die Ungeimpften auch der Kontaktinfektion am meisten ausgesetzt und müßten, wenn man nach dem 29. XI. eine Anzahl von Erkrankungen als Kontaktinfektionen ansehen will, unter diesen eher stärker vertreten sein als die Geimpften. Dann wäre also die Verzögerung des Krankheitsausbruchs bei den Geimpften im Verhältnis noch beträchtlicher. Ein anderer Einwand wäre der, daß die Epidemie gar nicht durch einmalige Speiseninfizierung, sondern durch mehrmalige Bacillenstreuung entstanden sei. Es wäre aber bei einer Bacillenträgerin, die — wie ich mich durch mehrmonatliche bakteriologische Überwachung überzeugte — nur periodisch Typhusbacillen ausschied, und die im Verlauf von vier Jahren wohl hauptsächlich dank ihrer außerordentlichen Sauberkeit und Pünktlichkeit so selten und nur so wenig zahlreiche Infektionen hervorgerufen hat, wenig wahrscheinlich, daß das besonders unglückliche Zusammentreffen von Umständen, das 1920 zu der Nahrungsmittelepidemie führen konnte, sich gleich nach einigen Tagen wiederholt oder mehrere Tage fortgesetzt haben sollte. Vor allem wäre aber dadurch nicht erklärt. warum die Geimpften durchschnittlich später erkrankten. Der dritte Einwand wäre der, daß von den Ungeimpften nur deshalb verhältnismäßig so wenige nach der Impfung (vom 29. XI.) erkrankten, weil gerade infolge dieser Impfung bei manchen von ihnen die Krankheit gar nicht mehr zum Ausbruch kam. Dann müßte man annehmen, daß die während der Epidemie vorgenommene Impfung bei den Ungeimpften wesentlich günstiger gewirkt haben müßte als bei den Geimpften, die doch sicher bereits eine größere Gewebsimmunität besessen haben mußten, bei denen also ein rasches Emporschnellen der Schutzstoffbildung zu erwarten war. Dies ist nach unseren sonstigen Erfahrungen durchaus unwahrscheinlich. Da auf der einen Seite die höchste Schutzwirkung einer Impfung erst in langsamem Anstieg und nicht vor mehreren Wochen erreicht wird und andererseits die Impfung vom 29. XI. erst in das Ende der Inkubationszeit fiel, wird man den tatsächlichen Verhältnissen sicher besser gerecht, wenn man bei dieser Berechnung, wie dies in Tabelle IV geschah, die Wirkung dieser Impfung unberücksichtigt läßt.



Aber selbst wenn man, um diesen Einwand völlig zu entkräften, die während der Epidemie ausgeführte Impfung berücksichtigt, so kommt man zu demselben Schluß:

Wie bereits oben ausgeführt, hat die Prozenterkrankungsziffer bei den zu Beginn der Epidemie Ungeimpften nach der Impfung um 17,9% ab-, bei den zu Beginn ein- oder mehrmals Geimpften um 4% zugenommen. Die Tatsache, daß die schon anfangs Geimpften nach der Impfung am 29. XI. eine absolute und relative Zunahme ihrer Erkrankungsziffer zeigten, kann nicht als Folge der während der Epidemie vorgenommenen Impfung angesehen werden, sie kann nur als Wirkung der früheren Schutzimpfungen im Sinn einer Verlängerung der Inkubationszeit erklärt werden.

Die Verzögerung des Krankheitsausbruchs kommt bei den Geimpften offenbar dadurch zustande, daß die durch die Impfung erzeugten Schutzstoffe die eingedrungenen Typhusbakterien nicht vernichten, sondern nur ihre Vermehrung verlangsamen.

Eine besondere, äußerlich betrachtet, gerade entgegengesetzte Wirkung hatte die *während* der Epidemie vorgenommene Schutzimpfung: Bei sechs Personen trat die Typhuserkrankung in unmittelbarem Anschluß an die Impfung auf. Die Impfreaktion ging hier in die Krankheit über. Diese Erscheinung wurde im Weltkrieg und ebenso bei der großen Kontaktepidemie unter der Zivilbevölkerung von Euskirchen[1]) häufig beobachtet, sie hat mit der angeblichen „negativen Phase" (*Wright*) nichts zu tun, da diese Kranken nach allen bisherigen Erfahrungen bezüglich der Schwere ihres Typhus nicht schlechter gestellt sind als die übrigen. Auch bei der Stiftungsepidemie sind bei den sechs unmittelbar nach der Impfung Erkrankten keine Todesfälle eingetreten; ihre Erkrankungen gehörten zum Teil zu den schwereren, ob infolge der Impfung, läßt sich bei einer Epidemie von 25 % mittelschweren und 36 % schweren Fällen nicht entscheiden. Es muß aber hierbei bemerkt werden, daß der bei der Stiftsepidemie verwandte frisch hergestellte Impfstoff überhaupt eine sehr starke Reaktion auslöste, und daß infolgedessen bei den Erkrankten die Neigung bestand, die Impfreaktion als den Beginn der Krankheit anzusehen. — Da immer nur ein verhältnismäßig kleiner Teil unmittelbar nach der Impfung erkrankt, handelt es sich offenbar um Typhen, die ohnehin kurz vor dem Ausbruch standen. Diese Erscheinung tritt also dann auf, wenn die Impfung erst im Ende der Inkubationszeit bei Personen, die ohnehin kurz vor dem Krankheitsausbruch standen, erfolgt. Es häuft sich hier die Wirkung der stark vermehrten lebenden Typhusbakterien und die der abgetöteten des Impfstoffes. Die Steigerung der Schutz-

[1]) *Basten*, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, S. 316.





wirkung kann sich hier nicht mehr in der Inkubationszeit, sondern erst während der Krankheit entfalten.

Da das mir zur Verfügung stehende Beobachtungsmaterial zahlenmäßig gering ist und mir ähnliche Beobachtungen von anderer Seite nicht bekannt sind, kann ich den Schluß, *daß die Schutzimpfung (besonders die wiederholte) den Ausbruch des Typhus verzögert*, nur als sehr wahrscheinlich aussprechen.

Weitere Beobachtungen hierüber sind in Anbetracht der wichtigen Folgerungen notwendig:

Einmal müßte bei Schutzgeimpften die Beobachtung der Ansteckungsverdächtigen — wenn auch in gemilderter Form — über den bisher vorgeschriebenen Zeitraum von drei Wochen ausgedehnt werden. Vor allem aber müßte versucht werden, *die Impfung so zu gestalten, daß die im Körper gebildeten Schutzstoffe nicht nur zur Verzögerung des Krankheitsausbruchs, sondern zur Unterdrückung der Krankheit ausreichen.* Ehe die praktischen Folgerungen hieraus gezogen werden können, muß noch auf eine andere Frage kurz eingegangen werden.

*Eintritt der höchstmöglichen Schutzwirkung.*

Nach den Beobachtungen von *Goldscheider* wird die höchste Wirksamkeit des Impfschutzes nach einer einzelnen Einspritzung jedenfalls nicht vor Ablauf von mehreren Wochen erreicht, bei mehrmaligen, in Zeitbeständen von 8—10 Tagen aufeinanderfolgenden Einspritzungen mit jeder weiteren Einspritzung etwas früher. Es ist ferner eine unbestrittene Tatsache, daß im Weltkrieg nach der allgemeinen zweiten Durchimpfung (0,5 und 1,0 ccm) eine deutliche Zunahme der Schutzwirkung im Vergleich zur ersten Impfung festzustellen war. Über die Frage, nach der wievielten, in Abständen von je einem Jahr vorgenommenen vollständigen Impfung der höchste Impfschutz erreicht wird, sind — soweit mir bekannt — die Erfahrungen aus dem Weltkrieg noch nicht veröffentlicht worden. Nach den Beobachtungen bei der Stiftsepidemie (Tab. II) sowie nach den Erfahrungen, die ich während einer nahezu dreijährigen Tätigkeit als Korpshygieniker im Feld machen konnte, *wurde der höchstmögliche Impfschutz meist schon nach der dritten jährlichen Impfung erreicht. Die weitere jährliche Impfung dient nur zur Aufrechterhaltung des erreichten Schutzes.* Nach den Beobachtungen bei der Tübinger Epidemie hat man auch tatsächlich den Eindruck, daß selbst bei mehrmals wiederholter jährlicher Impfung noch ein Unterschied in der Schutzwirkung besteht, je nachdem eine ununterbrochene Kette von jährlichen Impfungen bis zum Jahr vor der Infektion (einschließlich) reicht oder nur bis zum zweiten Jahr vorher (vgl. Tab. III). Bei den letztgenannten hat der Impfschutz — soweit man aus dem kleinen Zahlenmaterial Schlüsse ziehen kann —



infolge der Pause in den jährlichen Impfungen bereits etwas nachgelassen.

*Prophylaktische Schutzimpfung.*

Es gibt, wie gelegentliche Anfragen an das Württ. Medizinische Landesuntersuchungsamt zeigen, Fälle, in denen möglichst rasch ein möglichst hoher Impfschutz erreicht werden soll, z. B. wenn bei Heirat eines chronischen Bacillenträgers dessen Ehefrau oder bei Neuentdeckung eines Bacillenträgers dessen Familie gegen Typhus geschützt werden soll. In derartigen Fällen sollte man, um den Impfschutz rasch steigern zu können, unbedenklich statt nach den üblichen 8 bis 12 Monaten bereits nach 1—3 Monaten die zweite Impfung (0,5 und 1,0 ccm in sechs- bis achttägigem Zwischenraum) vornehmen.

*Schutzimpfung nach Ausbruch einer Epidemie.*

Bei der Frage, ob man auch nach Ausbruch einer Typhusepidemie noch impfen soll, besteht noch keineswegs Einigkeit. Man muß hier unterscheiden zwischen der Kontaktepidemie, bei der zunächst nur die Gefahr einer weiteren Verschleppung von Typhusbacillen gegeben ist, und der Nahrungsmittel- oder Trinkwasserepidemie, bei der die gefährdeten Menschen zum größten Teil die Krankheitserreger schon aufgenommen haben. *Bei einer Kontaktepidemie sollte man auch nach dem Ausbruch stets eine allgemeine Schutzimpfung vornehmen.* Je später hier die Geimpften die Krankheitserreger in sich aufnehmen, also je näher die Ansteckungszeit an den Zeitpunkt der höchsten Entwicklung der Schutzwirkung heranrückt, um so günstiger wird die Wirkung der Impfung sein.

Anders liegen die Verhältnisse bei der *Nahrungsmittel- und Trinkwasserepidemie.* Da die Schutzimpfung hier aus begreiflichen Gründen immer erst in vorgerückteren Inkubationsstadien erfolgt, so muß man mindestens die zeitlichen Zwischenräume zwischen den einzelnen Einspritzungen von den üblichen 6—8 auf 3—4 Tage verringern. Aber auch dann wird die 2. und 3. Einspritzung meistens zu spät kommen, um noch diejenigen vor der Erkrankung zu schützen, die die infizierten Nahrungsmittel oder Getränke genossen haben, es sei denn, daß ihre Inkubationszeit infolge früherer Impfungen verlängert wurde. Dagegen wird die 2. und 3. Einspritzung denjenigen noch einen gewissen Schutz gewähren können, die zwar noch keine Typhusbakterien aufgenommen haben, aber einer Kontaktinfektion ausgesetzt sind. Jedenfalls muß man meines Erachtens durch Messung der Körperwärme, zu vermeiden suchen, daß bei der Wiederholung der Einspritzung auch Personen mit der üblichen Impfstoffmenge gespritzt werden, bei denen die Typhuserkrankung bereits begonnen hat.



*Der Schwerpunkt liegt also darin, daß gleich die erste Einspritzung in ihrer Schutzwirkung verstärkt wird.* Die Anwendung von epidemieeigenem Impfstoff läßt nach sonstigen Erfahrungen über Autovaccine eine Steigerung der Schutzwirkung erwarten (— und ist auch bei Impfungen in Umgebung von Bacillenträgern zweifellos sehr zweckmäßig —), hat aber hier den Nachteil, daß über der Herstellung noch weitere wertvolle Tage verloren gehen, und daß die Reaktion bei frisch hergestelltem Impfstoff meist sehr heftig ist.

Wie mir durch persönliche Mitteilungen aus dem Feld bekannt ist, wurden 1, ja sogar 2 ccm Typhusimpfstoff als 1. Einspritzung in besonderen Fällen mehrfach verabreicht, ohne daß außer einer Verstärkung der Impfreaktion eine Schädigung auftrat. Ob bei der jetzt üblichen Herstellung des Typhusimpfstoffes für die 1. Einspritzung eine Menge von 1 ccm und bei einer etwaigen 2. eine noch größere Menge angewendet werden kann, muß im Einzelfall entschieden werden; daß dadurch eine Steigerung der Schutzstoffbildung erreicht wird, ist ziemlich sicher, ob diese Steigerung aber auch rechtzeitig innerhalb der Inkubationszeit eintritt, müssen weitere Erfahrungen lehren. Menschen mit schwachem Herz, auch Altersherz dürften einer derartigen Belastung nicht ausgesetzt werden. Es sollte daher angestrebt werden, einen Impfstoff herzustellen, der, ohne die Impfreaktion noch zu steigern, eine stärkere Schutzwirkung erzeugt.

In der Praxis wird man bei Ausbruch einer Epidemie noch nicht beurteilen können, ob es sich um eine Kontakt- oder Nahrungsmittelepidemie handelt. In Internaten und ähnlichen Anstalten sollte man meines Erachtens gleich beim ersten Beginn, also sobald auch nur zwei Typhuserkrankungen von unbekannter Herkunft innerhalb kurzer Zeit aufgetreten sind, eine allgemeine Schutzimpfung vornehmen. Nur dann besteht die Möglichkeit, daß die Impfung eine ausreichende Wirkung noch innerhalb der Inkubationszeit entfaltet, wenn auch ihre höchste Wirksamkeit erst viel später eintritt.

## *Zusammenfassung.*

Bei der im Tübinger Wilhelmsstift im November 1920 ausgebrochenen Nahrungsmittelepidemie zeigt sich eine deutliche Abstufung der Prozenterkrankungsziffer und der Prozentsterblichkeit entsprechend der Zahl der Impfungen. Die einmal Geimpften hatten eine wesentlich geringere Prozenterkrankungsziffer als die Ungeimpften, und die zwei- bis dreimal Geimpften eine erheblich geringere als die einmal Geimpften.

Der höchstmögliche Impfschutz besonders bezüglich der Sterblichkeit wird im allgemeinen durch die dritte Impfung erreicht. Die weiteren alljährlich vorzunehmenden Impfungen dienen zur Aufrechterhaltung des Impfschutzes.

Soweit aus den kleinen Zahlen geschlossen werden kann, hat man den Eindruck, daß bei den mehrmals Geimpften ein Unterschied in der Schutzwirkung besteht, je nachdem die jährlichen Impfungen in ununterbrochener Kette bis zum Jahr vor der Infektion heranreichten oder schon in früheren Jahren aufhörten. Im letztgenannten Fall hatte die Schutzwirkung bereits etwas nachgelassen.

Ob die während der Epidemie, in der Inkubationszeit vorgenommene Schutzimpfung ebenfalls die Prozentsterblichkeits- und Erkrankungsziffer herabgedrückt hat, läßt sich auf Grund der Tübinger Erfahrungen nicht entscheiden.

Obwohl das Zahlenmaterial klein ist, läßt sich doch mit großer Wahrscheinlichkeit sagen, daß die Schutzimpfung (besonders die mehrmalige) die Inkubationszeit verlängert.

Die Impfung muß so gestaltet werden, daß die gebildeten Schutzstoffe nicht nur zur Verzögerung des Krankheitsausbruchs, sondern auch zur Unterdrückung der Krankheit ausreichen.

Bei prophylaktischer Impfung sollte, wo es sich um rasche Erreichung eines möglichst hohen Impfschutzes handelt, der Zeitabstand zwischen 1. und 2., womöglich auch zwischen 2. und 3. Impfung von den üblichen 8—12 auf 1—3 Monate verringert werden.

Soll nach Ausbruch einer Epidemie geimpft werden, so muß schon gleich mit der 1. Einspritzung eine möglichst starke Schutzwirkung erreicht werden. Ob man zu diesem Zweck als 1. Einspritzung gleich 1 ccm oder noch mehr Impfstoff verabreichen kann, hängt vom Alter und Kräftezustand des einzelnen ab. Die Herstellung eines Impfstoffes von stärkerer Schutzwirkung ohne Vermehrung der Reaktionswirkung ist anzustreben.

(Aus dem Institut „Robert Koch“ [Abteilungsleiter: Dr. *Schiemann*].)

# Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Wunddesinfektionsmittel aus der Acridinreihe.

Von

**Dr. K. Weise,**

Assistent am Institut.

Die nachstehenden Untersuchungen bringen eine Weiterführung der Versuche von *Schiemann* und *Wreschner* in mehreren Richtungen. Zunächst war das inzwischen bekanntgegebene neue *Morgenroth*sche Präparat aus der Acridingruppe, Rivanol, nach der in den Wunddesinfektionsversuchen von *Neufeld* und *Reinhardt*, *Schiemann* und *Wreschner* benutzten Technik zu prüfen. Ferner erschien es wünschenswert, während die in der letztgenannten Arbeit gegenüber Streptokokken vorgenommenen Prüfungen der Wundantiseptica sich nur auf den hochvirulenten Streptokokkus Aronson erstreckten, außerdem noch verschiedene besonders frisch aus Infektionen vom Menschen gezüchtete Stämme für die Untersuchung der Wunddesinfektionsmittel zu verwenden. Besonders die aus eitrigen Prozessen des menschlichen Körpers stammenden Streptokokken zeigen im allgemeinen eine bedeutend geringere Virulenz als der Streptokokkus Aronson.

*Schiemann* und *Wreschner* hatten Vuzin nur in einzelnen Versuchen geprüft und dabei ziemlich unbefriedigende Ergebnisse erhalten. Mit Rücksicht auf die günstigen klinischen Berichte über Vuzin erschienen daher weitere vergleichende Versuche mit Trypaflavin und dem inzwischen empfohlenen Rivanol notwendig. Unter neuen Mitteln aus der Acridinstoffreihe wurden solche gefunden, die neben mehr oder weniger starker Wirkung auf Streptokokken in vitro hohe Beeinflussung gegenüber Staphylokokken zeigten. Diese zog ich daher auch zur Prüung im Tierexperiment heran.

Weitere Versuche mit virulenten und weniger virulenten Streptokokken betreffen die Frage, wie lange nach der Infektion durch desinfektorische oder chirurgische Maßnahmen die Weiterverbreitung der Keime verhindert werden kann. Auch einige Versuche, durch Allgemeinbehandlung mit Trypaflavin oder Rivanol die lokale und die sich daran anschließende allgemeine Infektion zu beeinflussen, wurden unternommen.



**Schließlich prüfte ich die Wirkung der Antiseptica auf Wundinfektionen mit anderen Erregern: mit Staphylokokken am Kaninchen und mit Tetanus und malignes Ödem haltiger Erde am Meerschweinchen.**

**Zunächst seien die Ergebnisse der in vitro für die Entwicklungshemmung gefundenen Werte mitgeteilt.**

*Reagensglasversuche mit Strepto- und Staphylokokken.*

*Tabelle 1.*

**Prüfung von 6 Acridinfarbstoffen und von Vucin auf die entwicklungshemmende Kraft gegenüber Streptokokken und Staphylokokken.**

**Die Lösungen werden in Aqua dest. (Vuzin auch in Kochsalzlösung) in fallenden Verdünnungsstufen hergestellt. Zu je 3,6 ccm 10 proz. Serumbouillon Zusatz von je 0,4 ccm Antisepticumverdünnung. Danach Einsaat von $^1/_{10}$—$^1/_{100}$ Tropfen Serumbouillonkultur.**

**a) Prüfung der Entwicklungshemmung in Serumbouillon. Volumen 4 ccm. Abstufung der Antisepticumverdünnungen in der Regel 1 : 2 : 4 usw. Es ist nur der letzte noch Entwicklungshemmung gebende Wert angegeben. Bei Benutzung der Abstufung 1 : 3 : 10 ist letzter negativer und erster positiver Wert angegeben.**

| | V. | Flavicid | Trypaflavin | Vuzin in Aq.dest. | Vuzin in NaCl-Lös. | IX | Rivanol | 1560 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| tokokkus nson | 400000 — | 200 000 — | 200000 — | 30000 — 100000 + | 30 000 + | 400000 — | 80 000 — | 40 000 — |
| ylococcus eus | 800000 — | 400 000 — | 80000 — | 80000 — | . | 200000 — 400000 ± | 40 000 — | 20 000 — |

**b) Toleranzprüfung an der Maus durch intraperitoneale Injektion von je 1 ccm der angegebenen Verdünnungen auf 20 g Maus.**

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| iert . . . . | 1 : 10 000 | 1 : 8000 | 1 : 2000 (1 : 2500) | 1 : 2000 | . | 1 : 2000 | 1 : 1000 | 1 : 500 |
| ? . . . . | 1 : 8000 | 1 : 6000 | 1 : 1500 | 1 : 1000 | . | 1 : 1000 | 1 : 500 | (1 : 100) |

**Das in den Tabellen angeführte Präparat Flavicid ist von *Langer* empfohlen und nach *Schiemann* und *Wreschner* im Tierversuch gegenüber Streptokokkus Aronson nicht unwirksam, jedoch dem Trypaflavin nicht ebenbürtig, während es in vitro gleich gut wirkte: es hob die Entwicklung bis 1:200 000 auf. Gegenüber Staphylokokken verhielt es sich erheblich günstiger. Präparat 1560 (2-Äthoxy-9-Äthanolaminoacridin) von *Morgenroth*, *Schnitzer* u. *Rosenberg*, dem Rivanol nahestehend, diesem jedoch im Tierversuch unterlegen, das uns von Herrn Geh.-Rat *Morgenroth* freundlichst überlassen wurde, ergab in vitro gegenüber Streptokokkus Aronson ziemlich gleichgute Werte, gegenüber Strept. Männe, einem mittelvirulenten, in längeren Passagen der Maus angezüchteten Streptokokkenstamm, erwies es sich viel unwirk-**

*Tabelle II.*

Wiederholte Prüfung zweier Streptokokkenstämme von verschiedener Resistenz gegenüber den in Tabelle I genannten Mitteln. — (+) bedeutet nach 24 Stunden Aufhebung der Entwicklung, bei Aussaat 1 Tropfen auf Blutagar erfolgt aber Wachstum.

| Versuch | | V. | Flavicid | Trypaflavin | Vuzin in Aq.dest. | Vuzin in NaCl-Lös. | IX. | Rivanol | 1560 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Streptokokk. Arons. | 1 Mill. — | . | 1 : 300 000 — (+) | . | . | . | 1:30 000 — | 1:30 000 — |
| 2 | „ „ | . | . | 1 : 200 000 — | . | . | 1:400 000 — | 1:80 000 — | 1:40 000 — |
| 3 | „ „ | . | 1:200 000 — | 1 : 200 000 — | 1:30 000 — | 1:30 000 + | . | 1:30 000 — | . |
| 4 | „ „ | 1:200 000 — | . | 1 : 200 000 — | . | . | 1:200 000 — / 1:400 000 — (+) | . | . |
| 5 | „ „ | 1:400 000 — | 1:200 000 — | 1 : 200 000 — | . | . | 1:400 000 — | . | . |
| 1 | Streptokokk. Männe | . | . | 1 : 300 000 — | . | . | . | 1:300 000 — | 1:30 000 — |
| 2 | „ „ | . | 1:100 000 — | 1 : 100 000 — (+) | 1:30 000 — | 1:30 000 — (+) | . | 1:100 000 — (+) | . |
| 3 | „ „ | 1:200 000 — | . | 1 : 200 000 — | . | . | 1:400 000 — | . | . |
| 4 | „ „ | 1:400 000 — | 1:400 000 — | 1 : 400 000 — | . | . | 1:400 000 — | . | . |

samer als Rivanol. V. und IX. sind neue Acridiniumverbindungen, die uns von den Elberfelder Farbenfabriken vorm. Bayer & Co. zur Verfügung gestellt wurden. Beide Präparate wirken wie Flavicid auch stark auf Staphylokokken, während die übrigen Mittel diesen gegenüber weit geringere Werte aufweisen. Wie aus Tab. II hervorgeht, wurde Trypaflavin mit allen Mitteln gleichzeitig geprüft. Starke Schwankungen in den gefundenen Werten ergaben sich bei V., während die anderen Antiseptica nur Schwankungen um eine Verdünnungsstufe aufzuweisen hatten. Ferner habe ich in der Tab. I gleichzeitig die bei intraperitonealer Injektion der Mittel für die Maus giftigen Dosen, berechnet auf 20 g Tiergewicht, mitgeteilt. *Behring* hatte schon darauf aufmerksam gemacht, daß die Desinfektionskraft der Antiseptica, sobald es sich um therapeutische Verwertbarkeit handelt, immer in Beziehung zur Giftigkeit für den Organismus gebracht werden muß. Berechnen wir nach den Versuchen in Tab. I einen solchen Quotienten, so ergeben sich, bezogen auf Streptokokken, gleiche Werte für Trypaflavin, Rivanol und 1560, günstiger verhält sich Präparat IX, schlechter V, Flavicid und Vuzin; bezogen auf Staphylo-

kokken sind die Unterschiede geringer; auch hier stellt sich IX am günstigsten, nach ihm V und Flavicid, während Rivanol, 1560 und Trypaflavin geringere Werte ergeben.

Natürlich kommen aber für die Beurteilung des therapeutischen Wertes noch andere Eigenschaften in Betracht. *Ehrlich* hat besonders auf die Verteilung im Organismus und die Organotropie und Parasitotropie der Mittel hingewiesen, d. h. den Grad ihrer Affinität einerseits zu den Geweben des Körpers, andererseits zu den Parasiten, Eigenschaften, die mit der Giftigkeit nicht parallel zu laufen brauchen. Sie können daher nur bei Anstellung von Heilversuchen aufgedeckt werden. Immerhin erscheint die Feststellung der relativen Giftigkeit beim Auswählen eines Desinfiziens für die Desinfektion im Tierkörper von Wert. Das haben auch *Morgenroth* und *Bieling* anläßlich ihrer Versuche mit Chininderivaten hervorgehoben. Neuerdings glaubt aber *Morgenroth* auf Grund seiner neuen Erfahrungen mit Acridinpräparaten den Wert des Reagensglasversuches sehr einschränken zu sollen. Er fand zunächst bei Untersuchung von homologen Alkoxyderivaten des 9-Äthanolaminoacridins, daß die im Reagensglas am besten wirksame Allylverbindung im Tierversuch schlechter wirkte als andere im Reagensglas nicht so wirksame Homologe, besonders als das oben erwähnte 2-Äthoxy-9-Äthanolaminoacridin. Letzteres wirkte aber im Tierversuch *im Gegensatz zum Vitro-Versuch* nur gegen bestimmte Streptokokkenstämme, während Rivanol ebenso wie Vuzin allen untersuchten Stämmen gegenüber wirksam war. Gerade auf Grund dieses letzteren auffallenden Befundes warnt *Morgenroth* davor, dem Reagensglasversuche entscheidende Bedeutung beizumessen, und verlangt eine Erprobung der Mittel im Tierversuch an einer großen Anzahl von Stämmen, um die in praxi notwendige „pantherapeutische" Wirksamkeit festzustellen. Wir haben systematische Versuche in dieser Richtung nicht angestellt, bisher jedoch keine Beobachtungen gemacht, wo in der angegebenen Weise die Ergebnisse in vitro und in vivo bei ein und demselben Mittel auseinandergingen. Wenn in unseren Versuchen ein Mittel verschiedene Stämme der gleichen Bakterienart in vitro etwa gleichgut, in vivo dagegen deutlich verschieden beeinflußte, so konnten wir die Differenz stets darauf zurückführen, daß der in vivo schlechter beeinflußte Stamm virulenter war.

Der große Einfluß der Virulenz auf den Ausfall aller chemotherapeutischen Versuche sowohl bei örtlicher wie bei Allgemeinbehandlung hat sich uns immer wieder gezeigt, ebenso die Schwierigkeit, den jeweiligen Virulenzgrad genau zu erkennen. Neben dem Verhalten der Kontrollen ist ein wichtiges Mittel dazu, daß man in jedem Versuch ein in seiner Wirksamkeit bekanntes „Standard"mittel mitprüft.



In Tab. I waren alle Reagensglasversuche mit dem hochvirulenten Strept. Aronson vorgenommen. Da ein weniger virulenter Streptokokkus sich möglicherweise abweichend verhalten konnte, untersuchte ich in Tab. II auch den Strept. Männe, der im Tierexperiment eine weniger schnell verlaufende Allgemeininfektion von der Wunde aus erzeugte. Tab. II läßt erkennen, daß Rivanol gegenüber Strept. Aronson viel schlechter, gegenüber dem mittelvirulenten Strept. Männe dagegen ebensogut wirkt wie Trypaflavin. Dieses Verhalten ist insofern interessant, als auch im Tierversuch der Strept. Aronson vom Trypaflavin etwas besser beeinflußt wird als vom Rivanol, während auf den Strept. Männe letzteres etwas besser wirkt.

*Tierversuche bei Wundinfektion mit Streptokokken verschiedener Virulenz.*

Im folgenden gebe ich vergleichende Untersuchungen mit der von *Schiemann* und *Wreschner* geübten Versuchsanordnung wieder, d. h. die im Reagensglas bereits verwandten Mittel wurden an streptokokkeninfizierten Flächenwunden auf dem Rücken einer Maus geprüft. Die bis auf die Fascie reichenden Wunden hatten eine Ausdehnung von etwa $1-1^1/_2$ qcm; sie wurden mit 1 Tropfen Streptokokkenserumbouillonkultur unter Verreibung mit der Kuppe eines Uhlenhuthröhrchens infiziert. Die Desinfektion geschah im allgemeinen nach 60 Minuten durch Bespülen mit je 2 ccm des Antisepticums unter sorgfältiger Benetzung der Wundtaschen. Die zur Kontrolle dienenden Wunden wurden in gleicher Weise mit physiol. NaCl-Lösung ausgespült. In den in den Tabellen angeführten Versuchen starben mit einer einzigen Ausnahme sämtliche Kontrollmäuse an Allgemeininfektion durch Streptokokken. Der Nachweis dafür wurde durch mikroskopische und kulturelle Untersuchung des Herzblutes und der Milz erbracht. Mäuse, die zerbissen waren oder ohne nachweisbaren Streptokokkenbefund interkurrent starben, sind von der Statistik ausgeschlossen worden.

Mit Rücksicht auf die erwähnten Beobachtungen von *Morgenroth* wandte ich für die Infektion außer den schon genannten Strept. Aronson und Männe 5 weitere Stämme (s. Tab. IV) an, die zwar weniger virulent waren, aber bei den Kontrolltieren doch zum Tode an Streptokokkämie führten. Gewonnen waren die Stämme aus menschlichem Eiter, 1 Stamm aus dem Blut eines Sepsiskranken; sie hatten nur 1—2 Mauspassagen durchgemacht. 5 weitere, in gleicher Weise gezüchtete Streptokokkenstämme erwiesen sich so wenig virulent, daß sie von der Wunde aus keine tödlich verlaufende Erkrankung hervorzurufen vermochten. Diese Versuche sind daher nicht verwertet worden.



Für die Infektion verwandten wir nicht nur die Serumbouillonkultur, sondern auch direkt das Blut einer an Sepsis verendeten Maus, also *tierische* Bakterien.

*v. Gaza* hatte neuerdings die Ansicht geäußert, daß die Wundantiseptica in erster Linie nur gegen Strepto- und Staphylokokken von *saprophytischem* Charakter eine Heilwirkung entfalten dürften. Diese Meinung vertrat er auf Grund der später zu besprechenden *Friedrich*schen Versuche, der durch Wundumschneidung eine tödliche Infektion verhindern konnte, doch nur, wenn die Wunde durch Treppenstaub mit malignem Ödem, nicht aber, wenn sie mit Gewebssaft daran verendeter Tiere infiziert waren. Zunächst seien die vergleichenden Untersuchungen mit dem hochvirulenten Strept. Aronson angeführt.

*Tabelle III.*

Prüfung der bereits angeführten Antiseptica bei Wundinfektion an Mäusen mit Streptokokkus Aronson als Serumbouillonkultur und in „tierischem“ Zustande (aus Herzblut einer verendeten Maus).

Desinfektion der infizierten Rückenwunde durch Bespülen mit je 2 ccm Antisepticumlösung nach 60 Minuten. 3 : 1 (1) bedeutet: Von 3 Versuchsmäusen wurde 1 gerettet, (1) starb später als das letzte Kontrolltier.

| | Versuch Nr. | | | | Gesamtergebnis |
|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| | 1/10 Tr. Serumbouillonkultur (S. B. K.) | 1/1 Tr. S. B. K. | 1/1 Tr. S. B. K. | 1/1 Tr. verdünntes Herzblut („tier.“ Bak.) | |
| Trypaflavin 1:500 . . . . | 2 : 2 | 2 : 2 | 3 : 0 | 3 : 3 | 10 : 7 |
| Rivanol 1:100 . . . . . . | 3 : 2 | 3 : 2 (1) | 3 : 0 | 2 : 2 | 11 : 6 (1) |
| Vuz. 1:100 in phys. NaCl.-Lös. | · | · | · | 3 : 0 | 3 : 0 |
| Acridin V 1:1000 . . . . . | · | 3 : 1 (1) | · | · | 3 : 1 (1) |
| „ IX 1:250 . . . . . | · | · | 1 : 0 | 1 : 0 | 2 : 0 |
| „ 1560 1:100 . . . . | 3 : 0 (1) | · | · | · | 3 : 0 (1) |
| Flavicid 1:500 . . . . . . | · | 3 : 0 | · | · | 3 : 0 |
| Rivanol 1:500 . . . . . . | 3 : 0 | · | · | · | 3 : 0 |
| 1560 1:500. . . . . . . . | 3 : 0 (1) | · | · | · | 3 : 0 (1) |
| Die Kontrollen starben nach Tagen | 2, 2, 3 | 2, 2, 2 | 1, 2, 4 | 2, 2, 2 | |

Wie die Zusammenstellung zeigt, ergab, abgesehen vom Versuch 3, in dem alle angewendeten Antiseptica versagten, Trypaflavin die günstigsten Resultate. Ihm steht Rivanol im Erfolge am nächsten. Von den übrigen Mitteln vermochte nur der Acridinfarbstoff V in der Konzentration 1 : 1000 von 3 Tieren 1 zu retten, 1 starb mit Verzögerung. Die nicht ang führten Verdünnungen 1 : 2000 und 3000 schützten nicht. Rivanol in der Konzentration 1 : 500 wurde nur in einem Versuch an 3 Mäusen verwandt, ohne therapeutischen Effekt, und ist dann in allen weiteren Experimenten als Lösung 1 : 100, also in recht hoher

Konzentration, angewandt worden. Diese ist nicht nur absolut, sondern auch relativ im Verhältnis zur Giftigkeit für Mäuse stärker als die für Trypaflavin benutzte. Andererseits ist die Verdünnung 1:500 Rivanol sowohl bezüglich der Wirkung auf Strept. Aronson in vitro wie bezüglich der Toxizität für Mäuse schwächer als die Trypaflavinlösung 1:500, die in den hier mitgeteilten Versuchen benutzt wurde. Der letzteren würde etwa eine Rivanollösung 1:200 entsprechen, die wir bisher aber nicht versucht haben. Dagegen erwies sich in früheren Versuchen die doppelt schwächere Konzentration von Trypaflavin (1 : 1000) mehrfach gut wirksam *(Reinhardt, Wreschner)*.

Ferner lehrt die Tabelle, daß „tierische" Bakterien ebenso wie Kulturbakterien durch desinfektorische Maßnahmen beeinflußt werden können. In dem einzigen Versuch (Nr. 3), in dem alle Desinfizientien ganz erfolglos blieben, sind gerade Kulturbakterien benutzt worden.

Die erwähnte Tatsache wird des weiteren durch die Tab. IV bestätigt, in der die aus eingangs erwähnten Gründen vorgenommenen Prüfungen verschiedener weniger virulenter Streptokokken enthalten sind.

*Tabelle IV.*

**Prüfung der Wundantiseptica im vergleichenden Tierversuch bei Infektion mit 6 verschiedenen Streptokokkenstämmen. Desinfektion nach 60 Minuten.**

| | Versuch Nr. | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | Gesamtergebnis |
| Bezeichnung des Streptokokkus-Stammes | Streptokokkus Männe | | | Strept. Kühne*) | Strept. 8 | Strept. 10 | Strept. 6 | Strept. Fuchs | |
| Art der Bakterien | 1/1 Tr. S. B. K. | | 1/1 Tr. „tier." Bakt. | 1/1 Tr. S. B. K. | 1/1 Tr. S. B. K. | 1/1 Tr. S. B. K. | 1/1 Tr. „tier." Bakt. | 1/1 Tr. S. B. K. | |
| Trypaflavin 1:500 | 3:2 (1) | 3 : 3 | 2 : 2 | 3:1 (2) | 1:0 (1) | 3 : 3 | 3 : 3 | 1 : 1 | 19 : 15 (4) |
| Rivanol 1:100 . . | 3 : 3 | 2 : 2 | 2 : 2 | 1 : 1 | 2 : 2 | 3 : 3 | 3:1 (2) | 2 : 2 | 18 : 16 (2) |
| Vuz. i. aq. dest. 1:500 | · | · | · | · | · | 3 : 2 | 3:0 (3) | · | 6 : 2 (3) |
| Vuzin i. NaCl.-Lös. 1:500 . . . . | · | 2:0 (1) | 2:0 (2) | · | 2 : 2 | · | · | · | 6 : 2 (3) |
| Acridin IX. 1:250 | 3 : 3 | 1 : 1 | · | 3 : 1 | · | · | · | · | 7 : 5 |
| „ 1560 1:250 | · | · | · | · | 1 : 1 | · | · | 1 : 1 | 2 : 2 |
| Flavicid 1:1000 . | 3:1 (1) | · | · | · | · | · | · | · | 3 : 1 (1) |
| Die Kontrollen starben nach Tagen: | 4, 6, 6 | 2, 3, 4 | 2, 6 | 1, 2, 3 | 3, 3 | 6,16,17 | 2, 2, 3 | 5, 7 1 Maus lebt | |

*) Strept. *Kühne* stammt aus dem Blut eines an Sepsis erkrankten Arztes.

Wie in Tabelle III, so zeigt sich auch hier eine ziemlich gleich gute Wirkung des Trypaflavins und Rivanols, die sich zugunsten des letztgenannten in geringem Maße dadurch verschiebt, daß bei ihm die Spättodesfälle an Streptokokken nicht auftreten. In Versuch 8 star-

ben nämlich von den trypaflavinbehandelten Mäusen 2 nach 6 bzw. 10 Tagen, in Versuch 9 eine Maus erst nach 13 Tagen mit spärlichem Streptokokkenbefund in der Milz; im Herzblut waren mikrokopisch keine Kokken nachweisbar, kulturell ging nur 1 Kolonie an.

Für „tierische“ und Kulturbakterien ergaben sich, wie schon gesagt, keine Unterschiede in der Wirkung der Mittel.

Nächst Rivanol und Trypaflavin zeitigt IX 1 : 250 gute Erfolge. Viel unwirksamer erweist sich Vuzin, sowohl in physiol. NaCl-Lösung wie in aqua dest. Bei einzelnen Streptokokkenstämmen wirkt es gut oder leidlich in der einen wie in der anderen Lösungsform, während es der Mehrzahl der Stämme gegenüber in seiner Desinfektionskraft dem Rivanol und Trypaflavin bei weitem unterlegen ist. Ebenfalls als schwach wirksam erscheint Flavicid 1 : 1000, während 1560 in der Dosierung 1 : 250 in Versuch 9 und 12 je 1 Maus rettete. Je 2 Tiere waren in beiden Versuchen totgebissen worden, so daß dieser Erfolg nicht hoch zu bewerten ist. Ferner ist zu bedenken, daß in Versuch 12 von den Kontrolltieren 1 am Leben blieb. Daher ist der Versuch nicht ganz als vollwertig anzusehen. In Anbetracht dieser Zufälle und der schlechten Wirksamkeit in Tab. III ist das Mittel jedenfalls nicht dem Trypaflavin und Rivanol gleichzusetzen.

5 weitere Versuche mit anderen frischgezüchteten Streptokokkenstämmen sind in der Tabelle nicht angeführt, da sie von der Wunde aus keine Allgemeininfektion bei den unbehandelten Tieren zu erzeugen imstande waren. Von ihnen vermochte nur 1 Stamm in 2 Versuchsserien 1 Kontrollmaus von 3 tödlich zu infizieren.

Im folgenden geben wir eine übersichtliche Zusammenstellung der meist angewandten Wundantiseptica wieder, in der der Heilerfolg prozentual berechnet ist.

*Tabelle V.*

*Zusammenfassung von Tabelle III und IV.*

| | Gegen Strept. Aronson | | Andere Streptokokken | | Insgesamt | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | von Gesamtz. | gerettet in % | von Gesamtz. | gerettet in % | von Gesamtz. | gerettet in % |
| Trypaflavin 1 : 500 | 10 | 70 | 19 | 78,9 | 29 | 75,8 |
| Rivanol 1 : 100 | 11 | 54,5 | 18 | 88,8 | 29 | 75,8 |
| Vuzin aq. dest. 1 : 500 | · | · | 6 | 33,3 | 6 | 33,3 |
| Vuzin in NaCl-Lösung 1 : 500 | 3 | 0 | 6 | 33,3 | 9 | 22,2 |
| Acridin IX 1 : 250 | 2 | 0 | 7 | 71,4 | 9 | 55,5 |

Die Tab. V zeigt, daß die Wirkung von Trypaflavin und Rivanol in den angewandten Konzentrationen im Gesamtergebnis eine gleichgute ist: Etwa 76% aller Tiere wurden durch Behandlung mit den genannten Mitteln gerettet. Von allen geprüften Substanzen zeigen sie



also den günstigsten therapeutischen Effekt. Ihnen steht der Acridinfarbstoff IX 1:250 mit 55,5% Heilung am nächsten.

*Versuche mit einem Streptokokkus von besonders hoher Virulenz.*

Weiterhin prüften wir in 2 Versuchsreihen nochmals gleichzeitig Trypaflavin 1:500, Rivanol 1:100, IX 1:250 und 1:1000, V 1:1000 und Flavicid 1:1000 gegenüber einer Kultur des Strept. Aronson von besonders hoher Virulenz (1:100 Millionen intraperitoneal tötete in 1—2 Tagen).

Im 1. Versuch dieser Art starben von je 3 Mäusen sämtliche mit Trypaflavin, Rivanol, IX 1: 250 und 1: 1000 und V behandelten Tiere, davon bei IX 1: 250 und 1: 1000 und V 1: 1000 je 1 mit Verzögerung von 3—4 Tagen, von den 3 Flavicidmäusen blieb 1 am Leben, 1 starb mit 8tägiger Verzögerung. Bei Wiederholung desselben Versuches blieben von 3 Trypaflavinmäusen 2 am Leben, bei Rivanol 1 von 3, bei IX 1 : 250 starben 2 Mäuse interkurrent nach 3 Tagen ohne Streptokokkenbefund, 1 Tier an Sepsis; bei IX 1: 1000 erlagen 2 der Streptokokkenallgemeininfektion, 1 starb interkurrent. Von den mit V 1: 1000 behandelten 3 Tieren überlebten 2 die Infektion, bei Flavicidbehandlung 1 von 3 Mäusen; die anderen beiden starben 1, bzw. 2 Tage nach den Kontrollen.

Die folgende Tab. VI zeigt das Ergebnis beider Versuche.

*Tabelle VI.*
Zwei Versuche mit Streptokokkus Aronson von besonders hoher Virulenz.
Infektion mit 1 Tropfen Serumbouillonkultur. Desinfektion nach 60 Minuten.

| Versuch Nr. | Trypaflavin 1:500 | Rivanol 1:100 | IX 1:250 | IX 1:1000 | V 1:1000 | Flavicid 1:1000 | Die Kontrollen starben nach Tagen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 13 | 3 : 0 | 3 : 0 | 3 : 0 (2) | 3 : 0 (1) | 3 : 0 (1) | 3 : 1 (1) | 2<br>2<br>2 |
| 14 | 3 : 2 | 3 : 1 | 1 : 0 | 2 : 0 | 3 : 2 | 3 : 1 (2) | 2<br>2<br>3 |

Das Resultat in Versuch Nr. 13 und 14 ist insofern merkwürdig, als die giftigsten Präparate V und Flavicid, die bei den bisher mitgeteilten Versuchen hinter anderen Mitteln erheblich zurückstanden, gegenüber maximal virulenten Keimen die beste Wirksamkeit entfalten. Auch Trypaflavin erwies sich hier dem am wenigsten giftigen Rivanol überlegen. Durch diese Beobachtung in 2 aufeinanderfolgenden Versuchsreihen ist man versucht, hier einen ursächlichen Zusammenhang zu sehen.

An dieser Stelle sei daher eine vergleichende Untersuchung über die Schnelligkeit der Abtötung von Streptokokken durch die beim Tierversuch benutzten Konzentrationen der Mittel in Serumbouillon mit-

geteilt. Als Antiseptica wurden V 1:1000, Trypaflavin 1:500 und Rivanol 1:100 verwandt. Geprüft wurden diese Mittel gegenüber Strept. Aronson und Männe.

*Tabelle VII.*

Abtötungsversuch mit V 1:1000, Trypaflavin 1:500 und Rivanol 1:100 gegenüber Streptokokkus Aronson und Männe.

Zu $1^1/_2$ ccm 10 proz. Serumbouillon, die mit dem Antisepticum vermischt ist, Zusatz von $^1/_2$ ccm Streptokokkenbouillonkultur, so daß das Antisepticum dann die zum Tierversuch verwandte Konzentration erreicht. Davon wird je $^1/_{20}$ Tropfen nach Verbleiben von 30 Minuten, 60 Minuten, 120 Minuten und 24 Stunden im Brutschrank in 15 ccm 10 proz. Serumagar gebracht und auf Platten ausgegossen. Ablesen des Ergebnisses nach 24 Stunden.

| | Anzahl der gewachsenen Kolonien nach | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 30 Min. | 60 Min. | 120 Min. | 24 Std. |
| | Streptokokkus Aronson. | | | |
| V 1:1000 | 900 | 0 | 0 | 0 |
| Trypaflavin 1:500 | 5 000 | 1 800 | 60 | 0 |
| Rivanol 1:100 | 11 000 | 30 000 | 5 000 | 0 |
| Kontrolle | 30 000 | 40 000 | 50—60 000 | 150 000 |
| | Streptokokkus Männe. | | | |
| V. 1:1000 | 60 | 0 | 1—30 | 0 |
| Trypaflavin 1:500 | 5 000 | 10 000 | 5 000 | 0 |
| Rivanol 1:100 | 2 000 | 1 000 | 100 | 0 |
| Kontrolle | 10 000 | 15 000 | 18 000 | 30 000 |

Wie der Versuch zeigt, tritt die Überlegenheit des giftigen Präparates V bezüglich der Schnelligkeit der Keimabtötung am deutlichsten hervor: Strept. Aronson wies bereits nach $^1/_2$ Stunde eine sehr geringe Keimzahl auf, nach 1 Stunde waren alle Streptokokken abgetötet.

Auch Trypaflavin bewirkte eine erheblich schnellere Keimabtötung gegenüber Strept. Aronson als das am wenigsten giftige Rivanol: Nach 2 Stunden waren bei Trypaflavin 60 Keime auf der Platte nachweisbar, während bei Rivanol noch 5000 gezählt wurden.

Die mit Streptokokkus Männe vorgenommene Untersuchung zeigte ebenfalls die Überlegenheit des Präparates V in der Schnelligkeit der Keimabtötung, während hier Rivanol besser als Trypaflavin wirkte: Nach 2 Stunden wies die Rivanolagarplatte nur 100 Keime, Trypaflavin dagegen 5000 Kolonien auf. Nach 24 Stunden war weder bei Strept. Aronson noch bei Männe ein Unterschied festzustellen: Sämtliche Keime waren abgetötet.

Im Zusammenhang mit dem Ergebnis der Versuche 13 und 14 (Tab. VI) scheint daher die Vermutung berechtigt, daß gerade bei *höchst*virulenten Keimen die Schnelligkeit der Abtötung von ausschlaggebender Bedeutung ist.





Als Nebenbefund sei erwähnt, daß die in den Agarplatten gewachsenen Kolonien von Strept. Aronson zum Teil eine gelbe Färbung, ähnlich wie bei Staphyl. aur., aufwiesen, so waren bei V nach 30 Minuten sämtliche Kolonien mit starker Gelbfärbung angegangen, bei Trypaflavin nach 30 Min. zum Teil leicht gelblich, zum andern Teil durchsichtig, der Norm entsprechend, nach 60 Min. deutlich gelb, und ebenso zeigte sich bei Rivanol nach 2 Stunden ein leicht gelbliches Wachstum. Es handelt sich um eine Variante, die wir auch sonst gelegentlich ohne Einwirkung von Chemikalien bei demselben Streptokokkus gesehen haben.

*Versuche mit spät einsetzender Behandlung.*

In allen bisher angeführten Tierexperimenten war die Desinfektion der Wunden nach 1 Stunde vorgenommen worden. *Schiemann* und *Wreschner* hatten gegenüber dem hochvirulenten Strept. Aronson bei Behandlung 4 Stunden nach der Infektion keine Wirkung der Mittel mehr gesehen.

Es schien von Interesse, ob bei weniger virulenten Stämmen, wie wir sie in den Versuchen in Tab. IV benutzt haben, nicht noch mit Desinfektion in späteren Zeiträumen Erfolge erzielt werden konnten. Dies war von vornherein nach den Beobachtungen *Reinhardts* bei Wundinfektion mit Hühnercholera und Pneumokokken zu erwarten. Auf Grund der Beobachtungen *Friedrichs* hatte man die Vorstellung gebildet, daß die Wunddesinfektionserreger zunächst eine Umwandlung in „tierische" Bakterien durchmachen müßten und nach dieser Umwandlung, die sich in etwa 6 Stunden vollziehen sollte, einer Desinfektion nicht mehr zugänglich seien. Wie u. a. aus den soeben mitgeteilten Versuchen hervorgeht, ist diese Annahme zum mindesten für die von mir untersuchten Erreger unrichtig. Die Zeit, während der eine erfolgreiche Wunddesinfektion möglich ist, läßt sich nicht schematisch festlegen, sondern hängt ceteris paribus von der Schnelligkeit ab, mit der der betreffende Erreger in das Gewebe eindringt und sich im Wirtskörper vermehrt, und diese Eigenschaft ist einer der wesentlichsten von denjenigen Faktoren, die die Virulenz bedingen.

Für die Versuche mit spät einsetzender Behandlung verwandte ich daher den Streptokokkus Männe, der eine längere Inkubationszeit hat.

*Tabelle VIII.* Infektion mit Strept. Männe.

| Versuch Nr. | 15 | | 16 | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Desinfektion nach Stunden: | 3 | 6 | 4 | 8 | 24 |
| Trypaflavin 1:500 . . . . | 3 : 3 | 3 : 3 | 1 : 1 | 1 : 1 | 3 : 2 |
| Rivanol 1:100 . . . . . . | 3 : 3 | 2 : 2 | 1 : 1 | 1 : 1 | 3 : 0 |
| Vuzin in aq. dest. 1:500 . | 3 : 0 | 3 : 0 (2) | • | • | • |
| Kontrollmäuse starben nach Tagen: | 6 und 7 | | 8 und 13 | | |

Die im 1. Versuche dieser Art (Nr. 15) nach 3 und 6 Stunden vorgenommene Desinfektion hatte für Trypaflavin und Rivanol einen vollen Erfolg: Alle Tiere wurden gerettet. Hingegen vermochte Vuzin bei 2 Tieren nur eine Verzögerung zu erzielen, merkwürdigerweise bei den nach 6 Stunden behandelten Tieren, während alle anderen mit den Kontrollen zusammen der Infektion erlagen. Vuzin wurde daher im nächsten Versuch (Nr. 16) nicht mehr angewandt. Allerdings starben von den nach 4 und 8 Stunden behandelten Tieren sehr viele interkurrent, so daß sie für eine Verwertung nicht in Betracht kommen. Immerhin geht aus der Tabelle hervor, daß auch nach 24 Stunden mit Trypaflavin eine Heilung durch Desinfektion der Wunde möglich ist, wenn auch nicht mit sicherem Erfolge. Rivanol wirkte nur bis zu 8 Std., alle 3 nach 24 Stunden behandelten Mäuse starben an Streptokokkensepsis.

*Besondere Versuchsanordnung bei Wundinfektion mit Streptokokken.*

Es schien erwünscht, den beispielsweise bei Sektionen oder Operationen vorliegenden Mechanismus der Keimübertragung im Tierversuch nachzuahmen. Es wurden dabei folgende Möglichkeiten ins Auge gefaßt:

1. Die Keime gelangen während der Verletzung mit dem Instrument, das sie verursacht, in die Wunde.

2. Die Wunde ist anfänglich nicht infiziert, und die Keime gelangen nachträglich hinein.

Zur Nachahmung des ersten Falles wurde die Spitze eines Skalpells in das Herzblut einer kurz zuvor an Strept. Aronson gestorbenen Maus eingetaucht und am Rücken einer Maus ein bis auf die Fascie reichender Schnitt von etwa 1 cm Länge angelegt. In beiden Versuchsreihen dieser Art nahm ich die Desinfektion nach 15 bzw. 60 Minuten vor, und zwar mit Trypaflavin in Lösung 1 : 500 und als 5 proz. Puder. Die Frühbehandlung wurde angewandt, da *Reinhardt* bei ähnlichen Versuchen mit Pneumokokken nur nach ganz kurzer Zeit Erfolge erzielt hatte. Bei dem 1. Versuch (Nr. 17) mit Behandlung nach 15 Minuten rettete Trypaflavin in Lösung alle 3 Mäuse, 5 proz. Puder 2 von 3 Mäusen. Die Anwendung des Antisepticums nach 60 Minuten (Nr. 18) vermochte in Form von Lösung von 3 Tieren nur 1 zu retten, als Puder bewirkte es bei einer Maus Verzögerung um 8 Tage, die beiden anderen Tiere starben in derselben Zeit wie die Kontrollen. Die schlechtere Wirkung des Puders ist vielleicht dadurch zu erklären, daß er trocken aufgetragen wurde: er wurde in dicker Schicht mit einer Hohlsonde in die Wunde gepreßt. *Schiemann* und *Wreschner* berichten, daß in ihren Versuchen trockener Puder leicht abfiel, und erzielten ihre guten Resultate wohl deshalb, weil sie die Wunde vor Auftragung des Puders





anfeuchteten. Sämtliche Kontrolltiere erlagen der Infektion durchschnittlich nach 1—2 Tagen.

Die Ursache der schlechteren Beeinflußbarkeit bei dieser Versuchsanordnung ist vor allen Dingen wohl darin zu suchen, daß im Gegensatz zu den früheren Versuchen mit größeren, klaffenden Wunden in diesem Falle eine wirksame Bespülung der infizierten Wunde bei deren Kleinheit nicht möglich ist. Vielleicht würde eine Umspritzung, wie sie *Morgenroth* bei seinen Versuchen vornimmt, günstigere Resultate ergeben. Daß „tierische" Bakterien an sich nicht schlechter zu beeinflussen sind als Kulturbakterien, geht aus den in Tab. III und IV mitgeteilten Versuchen hervor.

Die zweite Modifikation bestand darin, daß ich mit einem sterilen Skalpell eine 1 cm lange Wunde am Rücken einer Maus anlegte und diese erst nachträglich mit 1 Tropfen „tierischer" Bakterien unter starkem Verreiben in die Wundränder infizierte. In diesem Versuche (Nr. 19) wurde die Desinfektion nach 60 Minuten ausgeführt; das Ergebnis war ganz ähnlich wie in Versuch Nr. 18: Trypaflavin in Lösung rettete von 3 Tieren 1, 5 proz. Puder keines. Auch bei dieser Versuchsanordnung sind die Erreger für das Mittel wohl erheblich schwerer erreichbar als bei den anderen Versuchen mit klaffenden Flächenwunden.

*Tabelle IX.* Infektion mit Streptokokkus Aronson („tierische" Bakterien).

| Versuch | 17 | 18 | 19 |
|---|---|---|---|
| Art der Infektion | Infiziertes Skalpell | | 1 Tr. „tier." Bakt. aufgeträufelt |
| Desinfektion nach: | 15 Min. | 60 Min. | 60 Min. |
| Trypaflavinlösung 1:500 . . . . . | 3 : 3 | 3 : 1 | 3 : 1 |
| Trypaflavinpuder 5% . . . . . . | 3 : 2 | 3 : 0 (1) | 3 : 0 |

Die Kontrollen starben durchschnittlich nach 2 Tagen.

*Versuche mit Umschneidung der Wundränder nach Friedrich.*

Im ersten Versuch dieser Art wurde bei 12 Mäusen auf dem Rücken eine etwa 1 cm lange, die Haut gerade durchtrennende Schnittwunde mit einem Skalpell, dessen Spitze durch Eintauchen in das Herzblut einer an Strept. Aronson verendeten Maus infiziert war, angelegt. Nach 15, 60 und 120 Minuten wurde bei je 3 Mäusen die Hautwunde in einer Entfernung von etwa 2 mm umschnitten. Trotz Entfernung der Wundränder wurde kein Tier gerettet: Alle Mäuse starben in gleicher Zeit wie die unbehandelten 3 Kontrollen. Ebensowenig konnte ich bei einem weiteren Umschneidungsversuch, bei dem zur Infektion der in gleicher Weise mit einem *sterilen* Skalpell angelegten Rückenwunde der weniger virulente Strept. Männe in Serumbouillonkultur angewandt worden war, einen Erfolg erzielen, auch nicht bei den 3 Mäusen, bei denen



die Umschneidung schon nach 15 Minuten vorgenommen worden war. Sämtliche 12 Tiere, einschließlich der Kontrollen, erlagen nach 4 bis 8 Tagen der Infektion.

*Tabelle X.*

Anlegen einer 1 cm langen Rückenwunde; Infektion mit „tierischen“ bzw. Kulturbakterien. Umschneidung der Wundränder nach *Friedrich*.

| Versuch | Umschneidung der Wundränder nach: | 15 Min. | 60 Min. | 120 Min. | Kontrollen starben in |
|---|---|---|---|---|---|
| 20 | Strept. Aronson („tier.“ Bakterien) | 3 : 0 | 3 : 0 | 3 : 0 | 1, 2, 2 Tagen |
| 21 | Strept. Männe (in Serumbouillonkult.) | 3 : 0 | 3 : 0 | 3 : 0 | 4, 4, 8 Tagen |

Vergleichen wir diese Resultate mit denen bei Behandlung mit Trypaflavin, so zeigt sich in unseren Versuchen mit Septikämieerregern eine Überlegenheit der antiseptischen Wundbehandlung gegenüber der Umschneidungsmethode. Das spricht dafür, daß die Antiseptica nicht nur die oberflächlich gelegenen, sondern auch noch die bis zu einer gewissen Tiefe in die Gewebe eingedrungenen Erreger unschädlich zu machen imstande sind.

*Versuche mit Schwanzwunden an der Maus und anschließender Amputation.*

In einem früher bereits von *Schiemann* und *Wreschner* mitgeteilten Versuche von mir hatte die Amputation des Schwanzes 2 cm oberhalb der mit Strept. Aronson infizierten Schwanzwunde, vorgenommen 1 Std. nach der Infektion, vollen Erfolg gezeigt: Sämtliche Mäuse blieben am Leben, wobei zu bemerken ist, daß von den 5 Kontrolltieren 1 der Infektion nicht erlag. Ich versuchte daher, ob gegenüber dem weniger virulenten Strept. Männe bei Amputation 4 und 8 Stunden nach erfolgter Infektion noch Heilerfolge zu erzielen waren. Ebenso wie in dem erwähnten Versuche von *Schiemann* und *Wreschner* wurde bei 9 Mäusen 2 cm oberhalb des Schwanzendes ein Stückchen Haut abgetragen, die so entstandene Wunde mit dem Skalpell scarifiziert und dann mit 1 Tropfen Kulturbakterien infiziert. Die 3 Kontrollmäuse starben nach 4—10 Tagen, bei Amputation nach 4 Stunden blieb von 3 Tieren 1 am Leben, von den nach 8 Stunden amputierten Mäusen starben 2 nach 5 bzw. 7 Tagen ohne Streptokokkenbefund, 1 Tier wurde gerettet. Diese Ergebnisse zeigen wiederum, daß die Bedingungen bei *Schimmelbuschs* Versuchen mit Milzbrand doch recht einseitig und offenbar besonders ungünstig gewesen sind; die tödliche Allgemeininfektion schließt sich jedenfalls bei Streptokokken durchaus nicht immer so schnell an eine lokale Infektion an, wie man viel-

fach auf Grund der *Schimmelbusch*schen Versuche angenommen hat. Insofern scheint die mitgeteilte Beobachtung von erheblicher allgemeiner Bedeutung zu sein. Unsere Versuchsbedingungen entsprechen wohl nach Möglichkeit den natürlichen Verhältnissen.

Im Anschluß an die Milzbrandversuche von *Schimmelbusch* stellten *Schimmelbusch* und *Ricker* Untersuchungen über die Schnelligkeit der Resorption von Bakterien an. Sie brachten in Rückenwunden von Kaninchen große Mengen (1 Öse Agarkultur oder Bestreichen der Wunde mit einem in unverdünnte Bouillonkultur getauchten Glasstab) von apathogenen Keimen wie Wurzelbacillen und Bacillus pyocyaneus und konnten bei der Untersuchung der 5—10 Minuten darauf getöteten Tiere regelmäßig die Keime in den inneren Organen nachweisen. Dieser Zeitraum würde den Erfahrungen *Schimmelbuschs* bei seinen Amputationsversuchen entsprechen, wonach später als 5 Minuten nach der Infektion die Amputation des Schwanzes die Mäuse nicht mehr retten konnte. *Schimmelbusch* und *Ricker* sagen diesbezüglich: „Wenn in einigen Minuten die Bacillen schon in die inneren Organe geschleppt sind, dann ist naturgemäß auch die Lokaltherapie eine vergebliche." Danach müßte die antiseptische Wundbehandlung ebenso wie der schwere Eingriff einer Amputation, wenn sie später als 5 Minuten nach der Infektion angewandt wird, gleich zwecklos sein, zumal nach *Schimmelbuschs* Versuchen „bei hochvirulenten, septischen Keimen, bei welchen die Anwesenheit eines Bacillus oder Kokkus genügt, um die tödliche Erkrankung herbeizuführen, auch die Aufnahme dieses Keimes in den Blutkreislauf identisch mit dem Exitus des Tieres ist". Nun fanden aber *Schimmelbusch* und *Ricker* bei Untersuchung milzbrandinfizierter Kaninchen in der Zeit von $1-3^1/_2$ Stunden nach der Infektion keine Keime in den inneren Organen, und auch bei Mäusen waren Milzbrandbacillen zwar viel früher in den inneren Organen nachweisbar, jedoch offenbar zunächst hochgradig geschädigt; denn bei Transplantation der inneren Organe auf gesunde Mäuse ging die Infektion nach 1 und $1^1/_2$ Stunden nicht an, während kulturell bereits $^1/_2$ Stunde post infectionem Bakterien nachgewiesen wurden. Ich verweise auch auf die Beobachtungen von *Morgenroth* und seinen Mitarbeitern *Schnitzer* und *Munter*, wonach virulente Streptokokken im Mäusekörper eine Veränderung dahin erleiden, daß sie zum Teil auf Blutplatten grünes Wachstum aufweisen und gleichzeitig in ihrer Virulenz erheblich abgeschwächt werden.

Sollten unter natürlichen Bedingungen, also bei Infektion von Wunden mit den gewöhnlichen Eitererregern, vereinzelte Keime wirklich so schnell verschleppt werden, so zeigen unsere Versuche, daß sie nicht immer sogleich zur Erkrankung zu führen brauchen, *und darauf kommt es in der Praxis an.*

*Versuch mit Streptokokkeninfektion von Muskelwunden.*

Um festzustellen, ob auch tiefergehende, in die Muskulatur reichende Wunden einer antiseptischen Behandlung zugänglich seien, führte ich folgenden Versuch aus:

An dem Oberschenkel einer Maus wurde mit der Schere ein die Haut und die Muskulatur tief durchtrennender Schnitt gelegt; es entstand so eine flache, offene Muskelwunde. Nachdem die im Anschluß daran verhältnismäßig starke Blutung zum Stillstand gekommen war, wurde die Wunde mit 1 Tropfen Serumbouillonkultur von Strept. Männe infiziert und die Erreger mit der Kuppe eines Uhlenhuthröhrchens in die Wunde verrieben. Die Desinfektion geschah nach 15 und 60 Minuten durch Bespülen mit je 2 ccm von Trypaflavin- bzw. Rivanollösung, bei den Kontrollen mit physiol. NaCl-Lösung.

*Tabelle XI.*

Anlegen einer tiefen Muskelwunde, Infektion mit 1 Tropfen Strept. Männe in Serumbouillonkultur. Desinfektion nach 15 und 60 Min. durch Bespülen mit je 2 ccm Antisepticumlösung.

| | Desinfektion nach | |
|---|---|---|
| | 15 Minuten | 60 Minuten |
| Trypaflavin $^1/_{100}$ | 3 : 1 (2) | 2 : 1 (1) |
| Rivanol $^1/_{500}$ | 3 : 2 | 3 : 1 (1) |
| Die Kontrollen, mit phys. NaCl-Lösung behandelt, starben nach Tagen | 4, 5, 6 | 2, 5, 5 |

Von den 3 nach 15 Minuten behandelten Trypaflavinmäusen blieb 1 am Leben, 1 starb mit Verzögerung von 5 Tagen, eine 10 Tage später als die letzte Kontrollmaus und zeigte bei der Sektion eine von der Wunde ausgehende, sich nach der Bauchgegend erstreckende Phlegmone. Mikroskopisch und kulturell waren sowohl Streptokokken wie Staphylococcus aureus nachweisbar, im Herzblut und Milz Streptokokken. Von den beiden nach 60 Minuten mit Trypaflavin behandelten Tieren blieb 1 am Leben, das andere starb mit einer Verzögerung von 2 Tagen. Rivanol rettete nach 15 Minuten 2 Mäuse von 3, nach 60 Minuten eine, eine weitere starb mit 5tägiger Verzögerung.

Hiernach sind also auch mit Streptokokken infizierte tiefe Muskelwunden einer lokalen Desinfektion zugänglich, wenn auch, wie zu erwarten, die Erfolge ungünstiger sind als bei einfachen Hautwunden.

*Versuche mit Allgemeinbehandlung der Wundinfektion durch intraperitoneale Einverleibung der Antiseptica.*

Schließlich war die Frage zu untersuchen, ob angesichts der von *Neufeld* und *Schiemann* gefundenen chemotherapeutischen Eigenschaften



des Trypaflavins bei Allgemeinbehandlung bakterieller Infektionen Mäuse, die in einer Rückenwunde mit Streptokokken infiziert waren, durch intraperitoneale Applikation der Mittel geheilt werden könnten. In drei Versuchen dieser Art gelangte einmal Strept. Aronson und zweimal Strept. Männe zur Anwendung. Die Applikation der Antiseptica Trypaflavin und Rivanol geschah nach 60 Minuten. Trypaflavin wurde in der Verdünnung $^1/_{3000}$ und Rivanol $^1/_{4000}$ gegeben. Durch die intraperitoneale Behandlung konnte bei keiner Maus der Tod an Streptokokkenallgemeininfektion verhindert werden, jedoch starb 1 Maus, die Trypaflavin i. p. erhielt, mit einer Verzögerung von 2 Tagen nach dem Tode der letzten Kontrollmaus. Dies deutet wohl darauf hin, daß ein Erfolg auf diesem Wege zum mindesten nicht grundsätzlich ausgeschlossen ist. Die beim 1. Versuch (Nr. 23) zum Vergleich herangezogene lokale Behandlung schützte dagegen sämtliche Tiere.

*Tabelle XII.*

Rückenwunde einer Maus mit 1 Tropfen Kulturbakterien infiziert. Vornahme der Allgemeinbehandlung nach 60 Minuten.

| | Versuch Nr. | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 23 | | 24 | 25 |
| Art des Streptokokkenstammes | Strept. Männe | | Strept. Aronson | Strept. Männe |
| Art der Applikation des Mittels | i. p. | lokal | i. p. | i. p. |
| Trypaflavin $^1/_{3000}$ | 2 : 0 | 3 : 3 | 3 : 0 | 3 : 0 (1) |
| Rivanol $^1/_{1000}$ | 2 : 0 | 3 : 3 | 3 : 0 | 2 : 0 |
| Die Kontrollen starben nach Tagen | 5, 5, 8 | | 1, 2, 2 | 3, 5, 6 |

Die Allgemeinbehandlung von infizierten Rückenwunden durch i. p. Injektionen von Trypaflavin zeigte sich auch bei 2 weiteren Versuchen mit Strept. Aronson und Männe erfolglos. Hier wurde die i. p. Injektion von Trypaflavin $^1/_{2500}$ nach verschiedenen Zeiten vorgenommen, und zwar nach 15, 60 und 120 Minuten. Sämtliche 24 Tiere in beiden Versuchsreihen erlagen der Streptokokkeninfektion.

Die Aussichten, durch i. p. Injektion des Antisepticum eine von der Wunde ausgehende Infektion zu verhüten, waren bei Verwendung des hochvirulenten Strept. Aronson von vornherein geringe. Es mag dahingestellt bleiben, ob bei Benutzung von Erregern mit noch längerer Inkubationszeit und bei frühzeitiger, vielleicht intravenöser Injektion des Mittels nicht doch bessere Erfolge möglich sind. Das ist nicht unwahrscheinlich, da ja durch Trypaflavin und 3,6 Diaminoacridinnitrat in früher mitgeteilten Versuchen mit Pneumokokken und Hühnercholera i. p. infizierte Mäuse durch subcutane Einspritzung gerettet werden konnten, mit Streptokokken i. p. infizierte Mäuse aller-

dings bisher nur durch i. p. Behandlung. Für weitere Forschungen wird man allerdings sich das Ziel setzen, zur Allgemeinbehandlung nach Mitteln zu suchen, die geringere Organotropie zeigen als Trypaflavin und besonders Rivanol, und die demgemäß für die lokale Behandlung ungeeignet sein würden.

Die bisherigen Ergebnisse berechtigen wohl zu der Hoffnung, daß sich in der Acridinreihe, mit deren Durchforschung nach dieser Richtung man sich erst kurze Zeit beschäftigt, noch bessere Stoffe finden werden, die zum Teil für lokale, zum Teil für allgemeine Behandlung geeigneter sind als die bisher bekannten. Weniger wahrscheinlich ist es, daß ein Stoff gleichzeitig für beide Anwendungsarten optimal geeignet sein wird.

### *Staphylokokkenwundversuche am Kaninchen.*

Für die Praxis sind natürlich Mittel erwünscht, die nicht nur Streptokokken, sondern auch Staphylokokken beeinflussen. Trypaflavin ist bekanntlich empirisch in erster Linie gegen Staphylokokken empfohlen worden. Tierversuche in dieser Richtung liegen bisher unseres Wissens nicht vor; uns selbst ist eine zuverlässige Wundinfektion mit Staphylokokken bei Mäusen bisher nicht gelungen. In vitro beeinflußt Trypaflavin Staphylokokken unregelmäßig und jedenfalls lange nicht so hoch wie Streptokokken. Nach einer summarischen Mitteilung von *Morgenroth* konnte *Wreschner* eine bei Kontrollmäusen zur Abscedierung führende subcutane Staphylokokkeninfektion durch Umspritzung mit Rivanol copieren. In vitro wirkt Rivanol entwicklungshemmend auf Staphylokokken bis 1 : 40000 gegenüber 1 : 80000 bei Streptokokken. Da der Acridinfarbstoff IX nach meinen Reagensglasversuchen auch gegenüber Staphylokokken so wirksam wie auf Streptokokken war, prüfte ich ihn zusammen mit Rivanol und V am Kaninchen.

An beiden Oberschenkeln eines Kaninchens wurden nach Abscheren der Haare je zwei gerade, bis auf die Fascie reichende, ca. $1^1/_2$ cm lange Skalpellschnitte angelegt und sämtliche vier Incisionswunden mit $^1/_2$ ccm einer Aufschwemmung von Staphylokokken, enthaltend je $^1/_2$ Öse Staphylococcus aureus und albus gemischt, infiziert. Nach 1 Stunde fand eine einmalige Desinfektion durch Spülung mit je 2 ccm Rivanol 1 : 100, V 1 : 2000 und IX 1 : 500 statt; die vierte Wunde wurde mit 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung als Kontrolle ausgewaschen.

Die Kontrollwunde zeigte am ersten Tage geringe Schwellung, wenig Sekret, das aber mikroskopisch massenhaft Staphylokokken bei geringer Phagocytose enthielt. Am zweiten Tage waren die Wundränder stark entzündet und geschwollen, auch die Umgebung der Wunde entzündet; das Sekret war dickeitrig, also eine typische Wundeiterung. Mikroskopisch massenhaft Staphylokokken. Auch nach 5 Tagen waren die Wundränder noch wallartig geschwollen und die Umgebung entzündlich infiltriert. Mikroskopisch im dickeitrigen Sekret massenhaft Staphylokokken. Am zehnten Tage hatte sich eine Kruste gebildet, und die Entzündungserscheinungen waren im Abnehmen begriffen. Nach 19 Tagen waren diese abge-



klungen; man sah eine linsengroße, mit Schorf bedeckte Stelle in der Mitte des Schnittes; die Infiltration konnte man noch durch Betasten nachweisen.

Im Gegensatz zu diesen deutlichen, wenn auch lokal beschränkten und spontan zurückgehenden Infektionssymptomen heilten die desinfizierten Wunden ohne oder mit geringen entzündlichen Erscheinungen. Insbesondere erzielte IX einen durchschlagenden Erfolg. Hier waren die Wundränder am 2. Tage leicht verklebt, das Sekret bräunlich dünnflüssig und enthielt mikroskopisch nur spärlich phagocytierte Kokken. Auch in der Folge trat keine Infiltration auf und Staphylokokken waren nicht nachzuweisen.

Am 6. Tage war die Wunde verschorft, am 10. Tage in Abheilung begriffen. Am 19. Tage war auch durch Betasten keine Infiltration nachzuweisen.

Die mit Rivanol behandelte Wunde zeigte nach 3 Tagen geringe Entzündungserscheinungen (Rötung, Schwellung und geringe Infiltration); während nach 2 Tagen wenig Staphylokokken gefunden wurden, waren sie nach 3 Tagen etwas vermehrt. Am 6. Tage war auch hier keine Entzündung mehr nachweisbar. Am 10. Tage war die Wunde in Abheilung begriffen und am 19. Tage vernarbt, jedoch noch eine geringe Infiltration fühlbar.

Ganz ähnlich verhielt sich die mit V behandelte Wunde. Am 2. Tage waren die Wundränder leicht verklebt, im hellbräunlichen Sekret fanden sich spärlich Staphylokokken, von denen anscheinend mehr als bei Rivanol phagocytiert waren. Nach 3 Tagen bestand geringe Rötung und Schwellung der Wundränder und war ein geringes Infiltrat fühlbar. Am 6. Tage war die Wunde mit Schorf bedeckt und ohne Entzündungserscheinungen. Am 10. Tage begann die Abheilung. Am 19. Tage war die Wunde verheilt, in der Tiefe aber noch ein geringes Infiltrat fühlbar. Zur eitrigen Sekretion kam es also bei keiner von den drei behandelten Wunden.

Durch Ausstreichen einer Öse Wundsekret auf eine Agarplatte wurde der Keimgehalt jeder Wunden kontrolliert. Die unbehandelte Wunde ergab in den ersten 6 Tagen 800 und mehr Kolonien, und zwar mehr Staph. albus als aureus, später meist aureus. Der Ausstrich von der mit Rivanol behandelten Wunde ergab am 2. Tage 0 Staphylokokken, am 3. Tage ca. 80 Kolonien meist albus. Auch der Ausstrich von der mit V behandelten Wunde ergab am 3. Tage 2—300 Staphylokokkenkolonien, hauptsächlich albus. *Die Ausstriche von der mit IX behandelten Wunde blieben stets steril.*

Hiernach haben alle untersuchten Mittel eine deutliche Heilwirkung bei einer Staphylokokkenwundinfektion; am besten wirkte der Acridinfarbstoff IX.

## Anhang.

### *Ein Versuch mit Tetanus am Meerschweinchen.*

Nach *Brunner* soll ein brauchbares Wundantisepticum außer gegen Eitererreger möglichst auch gegen die anaerobe Infektion wirksam sein. In dieser Beziehung wurden von *Brunner* Jodpräparate und neuerdings auch Vuzin wirksam befunden. *Brunners* Versuchsanordnung bestand darin, daß er Meerschweinchen in der Nackengegend einen bis in die Muskulatur reichenden, 3 cm langen Skalpellschnitt beibrachte und diesen mit 0,05 g Münsterlinger Erde infizierte und vernähte; er hatte Erfolge mit Behandlung bis zu 18 Stunden nach der Infektion.

Ich habe einen ähnlichen Versuch mit je 0,05 g von *Brunner* zugesandter Münsterlinger Erde mit Trypaflavin angestellt. Ein Meerschweinchen, behandelt 5 Stunden nach der Infektion durch Einbrin-

gen von 0,2 g 5proz. Trypaflavinpuders (= 0,01 g Trypaflavin) wurde gerettet, während das nach 20 Stunden behandelte Tier ebenso wie die Kontrolle nach $2^1/_2$ Tagen unter ausgesprochen tetanischen Erscheinungen zugrunde ging.

**Schlußsätze.**

1. Bei weiteren vergleichenden Wunddesinfektionsversuchen mit verschiedenen Streptokokkenstämmen nach der Methode von *Reinhardt* wirkten Spülungen mit Trypaflavin (1 : 500) und Rivanol (1 : 100) eine Stunde nach der Infektion etwa gleich gut.

2. Gegenüber einem besonders virulenten Stamm des Streptokokkus Aronson hatten einige andere Acridinverbindungen, die sonst nicht so wirksam und dabei recht giftig waren, auffallend guten Erfolg. Vermutlich hängt das damit zusammen, daß dieselben Mittel in vitro Streptokokken besonders *schnell* abtöten.

3. Bei Infektion mit weniger virulenten Streptokokken waren die Ergebnisse, wie zu erwarten, erheblich besser als die von *Schiemann* und *Wreschner* mit dem hochvirulenten Streptokokkus Aronson. Bei einigen Versuchen mit einem Streptokokkus, der Mäuse von Wunden aus zwar ebenfalls sicher, aber langsamer (in 6—13 Tagen) durch Allgemeininfektion tötete, gelang die Rettung von Tieren durch Rivanol noch 8 Stunden, durch Trypaflavin noch 24 Stunden nach der Infektion.

4. Vuzin ergab viel schlechtere Erfolge als die genannten beiden Acridinstoffe.

5. Wundinfektionen mit „tierischen“ Erregern, d. h. mit Gewebssaft oder Blut von Streptokokkenmäusen wurden ebenso gut beeinflußt wie Infektionen mit Bouillonkulturen.

6. In infizierten linearen Schnittwunden sind die Erreger sowohl für antiseptische Spülungen als auch für Pulver schwerer zugänglich und die Erfolge daher schlechter als bei klaffenden Flächenwunden.

7. Mit Streptokokken infizierte tiefe Muskelwunden ergaben ebenfalls weniger gute Heilresultate; auch hier gelang es aber, durch einmalige Spülung 1 Stunde nach der Infektion einen Teil der Tiere zu retten.

8. Umschneidung der Wundränder von Hautwunden $^1/_4$ bis 2 Stunden nach der Infektion mit Streptokokken rettete im Gegensatz zur antiseptischen Behandlung keins unserer Versuchstiere.

9. Bei Infektion am Mäuseschwanz mit mäßig virulenten Streptokokken wurden durch Amputation noch nach 8 Stunden einzelne Mäuse gerettet, während in *Schimmelbuschs* Milzbrandversuchen die Operation schon nach 10 Minuten erfolglos blieb.

10. Bei einer (nicht tödlich verlaufenden) Staphylokokkenwundinfektion am Kaninchen zeigten sowohl Rivanol wie auch 2 neue, wegen

ihrer starken vitro-Wirkung auf Staphylokokken ausgewählte Acridinverbindungen eine deutliche Heilwirkung.

11. Auch auf die Infektion mit Anaeroben hatte Trypaflavin, in einem Versuch nach *Brunners* Methode geprüft, einen Einfluß.

## Literaturverzeichnis.

[1]) *Behring*, Bekämpfung der Infekt.-Krankh. 1912. — [2]) *Browning, Gulbransson, Kenneway* und *Thornton*, Brit. med. journ. 1917, S. 73—78. — [3]) *Brunner, von Gonzenbach* und *Ritter*, Bruns' Beiträge **111**, 572 und **125**, 277. — [4]) *von Gaza*, Grundriß der Wundversorgung und Wundbehandlung, S. 38. — [5]) *Langer*, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, S. 1015. — [6]) *Morgenroth*, Jahreskurse f. ärztl. Fortbild., Januarheft 1919. — [7]) *Morgenroth*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 8, S. 353. — [8]) *Morgenroth, Schnitzer* und *Rosenberg*, Dtsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 44. — [9]) *Morgenroth* und *Bieling*, Berl. klin. Wochenschr. 1917, Nr. 31. — [10]) *Neufeld* und *Schiemann*, Dtsch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 31. — [11]) *Reinhardt*, Zeitschr. f. Hygiene **95**, 27. — [12]) *Schiemann* und *Wreschner*, Zeitschr. f. Hygiene **95**, 424. — [13]) *Schimmelbusch*, Fortschr. d. Med. 1895. — [14]) *Schimmelbusch* und *Ricker*, Ebenda. — [15]) *Schnitzer* und *Munter*, Zeitschr. f. Hygiene **94**, 107.

(Aus der Abteilung für Chemotherapie des Instituts für Infektionskrankheiten „Robert Koch".)

# Zur chemotherapeutischen Biologie der Mikroorganismen.

## I. Mitteilung.

## Chemotherapeutische Antisepsis und Zustandsänderungen der Streptokokken.

Von

**J. Morgenroth** und **R. Schnitzer.**

Ein erfolgreiches Studium der chemotherapeutischen Antisepsis ist in demselben Maße wie jede chemotherapeutische Forschung überhaupt von dem tieferen Eindringen in die *Biologie der pathogenen Mikroorganismen* abhängig; mit vollem Recht hat *Ehrlich* neben dem Prinzip der chemischen Variation die Bedeutung dieser „chemotherapeutischen Biologie" stets in den Vordergrund gestellt.

So wäre es ohne die Erkenntnis der beiden von *Ehrlich* und seinen Mitarbeitern[1]) entdeckten und gründlich bearbeiteten Phänomene der Arzneifestigkeit und der Serumfestigkeit wohl kaum zu einer fruchtbaren Entwicklung der Chemotherapie der Trypanosomeninfektion gekommen.

Für die Ausgestaltung der *Chemotherapie bakterieller Infektionen*, insbesondere der Chemotherapie der Pneumokokkeninfektion durch Chinaalkaloide, bildete gleichfalls die biologische Erforschung der Pneumokokken eine wesentliche Grundlage. Auch hier trat zunächst das Moment der Arzneifestigkeit in den Kreis der Erscheinungen[2]). Wertvoll war ferner die Erweiterung unseres experimentellen Könnens in bezug auf die Infektion der Versuchstiere. Zu der bekannten Pneumokokkenbakteriämie der Maus trat als weitere Grundlage chemotherapeutischer Versuche die Bronchopneumonie des Meerschweinchens[3]) und

---

[1]) Siehe P. Ehrlich, Eine Darstellung seines wissenschaftlichen Wirkens. Jena 1914. Chemotherapeutische Studien von *J. Morgenroth*. S. 541.

[2]) *Morgenroth* und *Kaufmann*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. **15**, 610. 1912. — *Tugendreich* und *Russo*, Ebenda **19**, 156. 1913. — *Köhne*, Ebenda **20**, 512. 1914.

[3]) *Neufeld* und *Ungermann*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I Ref., **54**, 69. 1912. (Beiheft.) — *Engwer*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **73**, 198. 1912.

die Pneumokokkenmeningitis des Kaninchens[1]). Die Feststellung der verschiedenen serologischen Typen der Pneumokokken durch *Neufeld* und *Händel*[2]), die weitere Bearbeitung dieses Gebietes durch *Avery* und seine Mitarbeiter[3]) ließen es ferner notwendig erscheinen, etwaigen Zusammenhängen zwischen chemotherapeutischer und serotherapeutischer Beeinflußbarkeit der Pneumokokken nachzugehen. Es ergab sich eine weitgehende Unabhängigkeit der Empfindlichkeit der Pneumokokken gegenüber Optochin von dem Receptorenapparat der verschiedenen Typen[4]). Das Optochin kann also im Prinzip als ein „pantherapeutisches" Mittel den verschiedenen Pneumokokkentypen gegenüber angesehen werden. Es würde die Unterscheidung der Pneumokokkentypen mit dieser Feststellung aus dem Interessenbereich der chemotherapeutischen Biologie ausscheiden, wenn sie nicht ihre Bedeutung für die Kombinationstherapie beibehielte. Dem Versuch, die Pneumokokkeninfektion durch die Kombination von Optochin und Pneumokokkenserum zu behandeln, muß selbstverständlich die volle Berücksichtigung der Typen zugrunde liegen.

Was nun die *chemotherapeutische Antisepsis* betrifft, so haben die bisherigen experimentellen Studien aus der Vertiefung unserer Kenntnis der Biologie der hier in Frage kommenden Mikroorganismen mannigfache Förderung erfahren. Vor allem sind zuverlässige und deshalb für vergleichende Versuche verwertbare Methoden der örtlichen Infektion kleiner Versuchstiere ausgearbeitet worden, so für Meerschweinchen für Gasbrand[5]), bei der Maus für Streptokokken und Staphylokokken[6]).

*Brunner* und seine Mitarbeiter[7]) bedienten sich im Anschluß an *Friedrichs* Versuche einer mechanischen Antisepsis der Infektion mit sporenhaltiger Erde zur vergleichenden Prüfung älterer Antiseptica. *Morgenroth* und *Bieling* (l. c.) prüften die Chinaalkaloide an der subcutanen Gasbrandphlegmone des Meerschweinchens, wobei sie zur Infektion Ödemflüssigkeit, also „angezüchtete" Erreger verwandten.

---

1) *J. A. Kolmer* und *G. Idzumi*, Journ. of infect. dis. **26**, 355. 1920.

2) Siehe *Neufeld* und *Händel*, Kapitel Pneumokokken in Kolle-Wassermann. Handb. d. Path. Mikroorganism. 2. Aufl. Bd. **4**. S. 527. 1912.

3) *Avery, Chickering, Cole* und *Dochez*, Monograph. Rockefeller Inst. 1917. Nr. 7.

4) *Moore*, Journ. exp. med. **22**, 269. 1915. Schon vorher stellte *R. Levy* im Tierversuch die Empfindlichkeit eines Pneumococcus mucosus für Optochin fest. Berl. klin. Wochenschr. 1912, Nr. 53.

5) *Morgenroth* und *Bieling*, Berl. klin. Wochenschr. 1917, S. 723 und *R. Bieling*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap., Orig., **27**, 65. 1918.

6) *Morgenroth* und *Abraham*, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, S. 57. — *Morgenroth, Schnitzer* und *Rosenberg*, Ebenda 1921, Nr. 44. — *Morgenroth*, Klin. Wochenschr. 1922, S. 353.

7) *Brunner, v. Gonzenbach* und *Ritter*, Bruns' Beitr. z. klin. Chirurg. **111**. 1918.

Besonders die fortschreitende Streptokokkenphlegmone im Unterhautbindegewebe der Maus bildete eine bis dahin unbekannte Form langsam verlaufender örtlicher und allgemeiner Infektion, die nach allen bisherigen Erfahrungen ein ausgezeichnetes Modell für die Tiefenantisepsis beim Menschen abgibt [*Morgenroth* l. c.[1])].

Für die experimentelle Erforschung der Flächenantisepsis arbeitete *Neufeld* mit seinen Mitarbeitern[2]) Methoden aus, bei denen die Beeinflussung der Allgemeininfektion durch hochvirulente Erreger — Streptokokken, Pneumokokken, Hühnercholerabacillen — als Kriterium für die örtliche antiseptische Wirkung benutzt wurde. Es gelang mit Hilfe dieser Methode, eine weitgehende Beeinflußbarkeit der Infektion durch die antiseptische Behandlung der Wunden zu zeigen. Vorher hatte *Feiler*[3]) Versuche mit ähnlicher Methode an Diphtheriebacillen ausgeführt, deren methodische Brauchbarkeit durch *Neufeld* und *Reinhard* (l. c.) stark eingeschränkt erscheint.

Das Moment der spezifischen Festigkeit spielt nach unseren bisher veröffentlichten Versuchen bei Gasbrandbacillen (*Morgenroth* und *Bieling*, l. c.) und bei Staphylokokken[4]) keine Rolle. Eben erschienene Versuche von *Mayeda*[5]) an Staphylokokken mit Vuzin beweisen, im Gegensatz zu der Meinung des Autors, nichts für eine Gewöhnung der Staphylokokken an höhere Vuzinkonzentrationen.

Was den Zusammenhang chemotherapeutischer Auswirkungen mit Immunitätserscheinungen betrifft, so dürften bei der experimentellen Heilung der Streptokokkenphlegmone der Maus, besonders bei der damit einhergehenden Einwirkung auf die Allgemeininfektion, *Erscheinungen aktiver Immunität* eine Rolle spielen (*Morgenroth*, l. c.). Die eigenartige, rasch eintretende Beeinflussung virulenter Streptokokken durch eine schon vorhandene Infektion, die wir als *Depressionsimmunität* bezeichnen[6]), können bei der Betrachtung chemotherapeutischer

[1]) *Braun* (Klin. Wochenschr. 1922, S. 761) berichtet neuerdings, daß ihm regelmäßige Infektionen dieser Art nicht gelungen seien. Woran dies liegt, läßt sich erst beurteilen, wenn er seine mißlungenen Versuche mit den nötigen Einzelheiten veröffentlicht haben wird. In unserem Laboratorium wird das Verfahren jetzt seit über 3 Jahren ohne Störung geübt; wir haben mit ca. 150 verschiedenen Streptokokkenstämmen typische Phlegmonen erzeugt.

[2]) *Neufeld* und *Reinhard*, Dtsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 27. — *Reinhard*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **95**, 1 u. 27. 1922. — *Schiemann*, Ebenda **95**, 69. 1922. — *Schiemann* und *Wreschner*, Ebenda **95**, 424. 1922.

[3]) *Feiler*, Dtsch. Zeitschr. f. Chirurg. **164**, 379. 1921.

[4]) *Morgenroth* und *Tugendreich*, Berl. klin. Wochenschr. 1916, Nr. 29 und Biochem. Zeitschr. **79**, 257. 1917.

[5]) *T. Mayeda*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I Orig., **88**, 222. 1922.

[6]) *Morgenroth*, *Biberstein* und *Schnitzer*, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 13. — *Schnitzer* und *v. Kühlewein*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **92**, 492. 1921. — *Morgenroth* und *Abraham*, Ebenda **94**, 163. 1921.



Wirkungen auf dem Gebiete der Streptokokkeninfektion nicht mehr außer acht gelassen werden.

Endlich erscheint von größter Bedeutung das Studium der *Virulenzabschwächung der Streptokokken* als einer durch die Einwirkung chemotherapeutischer Agentien hervorgerufenen Erscheinung. Schon *Morgenroth* und *Tugendreich* (l. c.) beschrieben ausführlich einen Versuch, in welchem ein Streptokokkenstamm in vitro unter der Wirkung des Eukupins seine hohe Virulenz mit einem Schlage verlor.

Im Zusammenhang mit diesem Verhalten steht wohl die zuerst von *Morgenroth* und *Bumke*[1]) mehrfach bei hämolytischen Streptokokken gemachte Beobachtung, daß die Streptokokken „unter Umständen durch die Einwirkung der Chinaalkaloide für kurze Zeit ihre hämolytische Fähigkeit verlieren". Wir haben dieses Verhalten bei Reagensglasversuchen mit Streptokokken seitdem oft bestätigen können. *Morgenroth*[2]) hat unsere bisherigen Erfahrungen darüber in den folgenden Sätzen zusammengefaßt: „Es ist ein immer wiederkehrendes, überraschendes Resultat, daß man in Reihenversuchen, die man mit Eukupin an Streptokokken anstellt, drei Phasen beobachten kann: Eine Phase, in der die Konzentration hinreicht, um die Streptokokken abzutöten; eine zweite Phase, in der eine Abtötung der Streptokokken nicht erfolgt, bei der aber die hämolytische Fähigkeit in Verlust gegangen ist — sie stellt sich bei Fortzüchtung auf Blutplatten nachher wieder ein —, und eine dritte Phase, in der weder eine Keimverminderung noch eine Beeinträchtigung der Hämolyse stattfindet."

Auch bei einem Streptokokkus, der aus einem mit Eukupin behandelten Falle gezüchtet war, beobachtete *Koch* (l. c.) in unserem Laboratorium zunächst anhämolytisches Wachstum, das er auf die Wirkung des Eukupins zurückführte.

Auf die Beziehungen zwischen Verlust der Hämolyse und Virulenzverminderung der Streptokokken durch Chinaalkaloide hat *Fr. Meyer*[2]) hingewiesen. Er hatte gefunden, daß hochvirulente Streptokokken, die man auf Blut von Patienten züchtet, die größere Dosen Eukupin erhalten haben, in ihrer Virulenz abgeschwächt werden und gleichzeitig das hämolytische Wachstum einbüßen. Das gleiche erzielt man, wenn man dem Blute Eukupin zusetzt.

Neuerdings berichtete *Fr. Meyer*[3]), daß auch in dem Blute von Menschen, welche mit Rivanol behandelt wurden, eingesäte Streptokokken einen Verlust der hämolytischen Fähigkeit und eine Virulenzabschwächung erleiden. Er nimmt an, daß die Heilung der Streptokokkeninfektion auf dem Wege über die Virulenzabschwächung erfolgt.

[1]) Siehe: *K. Koch*, Virch. Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **227**, 39. 1919.
[2]) *Morgenroth*, Berl. klin. Wochenschr. 1919, S. 1172, ebenda auch *Fr. Meyer*.
[3]) *Fr. Meyer*, Berl. klin. Wochenschr. 1921, S. 1539.



Diese knappe Übersicht zeigt, daß die chemotherapeutische Biologie der Mikroorganismen in erheblichem Maße sich mit den Beziehungen zwischen Mikroorganismus und Wirt beschäftigt und auf diese Weise den engen Zusammenhang zwischen Chemotherapie und Immunitätslehre noch mehr zu befestigen geeignet ist.

Im folgenden soll über die Beziehungen zwischen dem chemotherapeutischen Verhalten der Streptokokken und einem in unserem Laboratorium zuerst beobachteten und eingehend bearbeiteten Immunitätsphänomen[1]) berichtet werden.

Die von uns untersuchten Zustandsänderungen der Streptokokken erfolgen in den ersten Stunden nach der experimentellen Infektion der Maus mit hämolytischen Streptokokken, indem — zweifellos unter dem Einfluß der Schutzkräfte des infizierten Organismus — in größerem oder geringerem Umfange eine Abspaltung von Keimen in neuartigem Zustande stattfindet. Das wesentlichste Moment dieser Zustandsänderungen der Streptokokken — und zwar von Streptokokken jedes Virulenzgrades — beruht *auf einem Sturz der Virulenz für Mäuse*, wie wir ihn in jedem bisher untersuchten Falle festgestellt haben. Es wäre weder Anlaß gewesen, nach diesem Virulenzverlust zu fahnden, noch wäre die Möglichkeit gewesen, den Anteil einer Streptokokkenpopulation zu ermitteln, der diesem Virulenzverlust unterliegt, wenn derselbe nicht einen Indicator *in dem Verlust der Hämolyse* fände. Durch diesen Zusammenhang ist man in der Lage, festzustellen, daß 1—4 Stunden nach der Infektion aus den getöteten Mäusen Streptokokkenkolonien zu züchten sind, welche die hämolytischen Eigenschaften verloren haben, auf der Blutagarplatte „vergrünt“ erscheinen und damit ihren Virulenzverlust anzeigen. Es muß dabei hervorgehoben werden, daß aus einer derartigen Population auch hämolytische Kolonien sich entwickeln, die gleichfalls einen erheblichen Virulenzverlust erlitten haben (*Schnitzer* und *Munter* II. Mitteilung, l. c.).

Bei der überragenden Bedeutung, welche den Streptokokken für die theoretische und praktische Erforschung der chemotherapeutischen Antisepsis zukommt, erschien es geboten, die Empfindlichkeit der Streptokokken in dem neugewonnenen Zustand gegenüber unseren wirksamsten Agenzien zu untersuchen. Wir wählten bis jetzt für diesen Zweck das *Vuzin* als Vertreter der Chinaalkaloide und das *Rivanol* als Vertreter der 9-Aminoacridine.

Wir möchten hier darauf hinweisen, daß Änderungen einer Gesamtpopulation von Keimen in bezug auf die Empfindlichkeit gegen spezifisch schädigende bzw. chemotherapeutisch wirkende Agenzien bei Pneumokokken bekannt sind.

[1]) *Schnitzer* und *Munter*, I. Mitt. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **93**, 96. 1921. II. Mitt. Ebenda **94**, 107. 1921. Siehe auch die vorläufige Mitt. *Morgenroths*, Berl. klin. Wochenschr. 1919, S. 1172.





Es handelt sich aber hier nicht etwa um die Abspaltung von besonderen Dauermodifikationen, sondern um Veränderungen der Gesamtpopulation, wie sie bei Fortzüchtung auf künstlichen Medien im Laufe längerer oder kürzerer Zeit eintreten können. So geben avirulente, längere Zeit fortgezüchtete Pneumokokkenstämme nicht mehr die *Neufeld*sche Gallenreaktion (*Neufeld* und *Händel* l. c.). Ebenso kann nach vielfachen Beobachtungen in unserem Laboratorium eine unter Umständen sehr weitgehende Verminderung der Optochinempfindlichkeit der Pneumokokken bei Fortzüchtung in künstlichen Nährböden auftreten.

So zeigte der seinerzeit von *Neufeld* erhaltene Pneumokokkus Ia, der sich jahrelang in vielen Versuchen bewährt hatte, 1917 ein plötzliches Absinken der Empfindlichkeit gegen Optochin. Erst eine Anzahl von Tierpassagen stellte die normale Empfindlichkeit wieder her.

Daß das Fehlen der Gallenreaktion und der Optochinempfindlichkeit in vitro zusammenfallen kann, beobachtete *Nachmann*[1]) an zwei Stämmen von Pneumococcus mucosus, die übrigens nicht völlig avirulent waren. In einem anderen Falle, den *Rochs*[2]) aus unserem Laboratorium beschrieben hat, gab ein sehr wenig virulenter Pneumokokkus anfangs negative Gallenreaktion, die positiv wurde, als es gelungen war, den Stamm tierpathogen zu machen. Hier ging die Optochinunempfindlichkeit nicht parallel mit der Gallenreaktion, denn Optochin tötete schon nach 2stündiger Einwirkungszeit bei 37° in der Verdünnung 1 : 160 000 (weitere Verdünnungen wurden nicht angewandt) die Pneumokokken ab. Ein interessanter Fall dieser Art, bei dem offenbar die Pneumokokken bei der Fortzüchtung ihre spezifische Optochinempfindlichkeit verloren und bereits nach *einer* Tierpassage wiedergewonnen haben, ist von *Köhne* (l. c.) aus *Neufelds* Laboratorium beschrieben und von *K. Koch* (l. c.), der aus unserem Laboratorium noch über einige weitere optochinunempfindliche Stämme berichtet, in diesem Sinne besprochen worden. Die praktische Konsequenz aus diesen Erfahrungen faßt schon *Koch* in dem Satze zusammen: „Der Befund einer größeren oder geringeren Resistenz gegen Optochin bei Pneumokokkenstämmen, die nicht völlig frisch untersucht werden, beweist nichts in bezug auf deren ursprüngliches Verhalten.“

Im folgenden berichten wir über Reagensglasversuche mit Vuzin und Rivanol an experimentell durch kurzdauernde Tierpassage in den grünen Zustand übergeführten hämolytischen Streptokokken. Die Umwandlung der hier benutzten Streptokokkenstämme ist bereits von *Schnitzer* und *Munter* (I. Mitteilung, l. c.) ausführlich beschrieben worden. Bei den vorliegenden Versuchen wurden zur selben Zeit die durchaus gleichartig behandelten Stämme im hämolytischen und grünen Zustande in parallelen Versuchsreihen untersucht.

Auf die Versuchstechnik, die sich im großen und ganzen an die in unserem Laboratorium übliche, von *Morgenroth* und *Tugendreich* (l. c.), *Morgenroth* und *Bumke*[3]) bereits beschriebene Methodik hält, wollen wir hier nur ganz kurz eingehen. Die Streptokokken — es handelt sich um frisch von menschlichen Erkrankungen gewonnene Stämme — werden auf Blutagar (8% Ziegen- oder Pferdeblut enthaltend) und in Serumbouillon (10% Pferdeserum) gezüchtet und täglich, höchstens jeden zweiten Tag in wechselndem Turnus, Blutagar—Serumbouillon—Blut-

[1]) *Nachmann*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I. Orig., **77**, 198. 1915.

[2]) *Rochs*, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. **220**, 388. 1915.

[3]) *Morgenroth* und *Bumke*, Dtsch. med. Wochenschr. 1914, S. 538.





agar und so fort, überimpft. Zu den Versuchen wurde stets 24stündige Serumbouillonkultur der Stämme verwandt. Mit je einem Tropfen solcher, im Verhältnis 1 : 10 mit steriler Serumbouillon verdünnten Kultur wurden dann die Röhrchen beimpft, die in je 2 ccm Serumbouillon fallende Verdünnungen des Rivanols bzw. des Vuzins enthielten. Nach ca. 20stündiger Bebrütung wurde mit je 1 Öse aus jedem Röhrchen ein langer Impfstrich auf Blutagar angelegt und das endgültige Ergebnis des Versuches nach 24stündiger Bebrütung der Blutagarplatten abgelesen. Zur Kennzeichnung der Stärke des Streptokokkenwachstums auf der Blutagarplatte verwenden wir die folgenden Zeichen:

0 = kein Wachstum von Streptokokken.
(+) = bis 50 Kolonien.
\+ = bis 200 Kolonien.
++ = zahlreiche, gut getrennte Kolonien.
+++ = dichter Rasen konfluierter Kolonien.
— = nicht abgeimpft.

*Versuch 1. Str. Ur.* wurde am 15. II. aus Blut bei Sepsis gezüchtet. Der Stamm bildete auf Blutagar zarte, stark hämolytische Kolonien, in Serumbouillon wuchs er trübe mit starkem Bodensatz. Am 17. II. werden aus dem durch Punktion gewonnenen Peritonealexsudat einer mit 0,3 ccm einer 1 : 10 000 verdünnten Serumbouillonkultur intraperitoneal infizierten Maus 2 Stunden nach der Infektion zahlreiche anhämolytische Kolonien gezüchtet, die nach einer Blutagarpassage *grünes Wachstum* zeigten und bei weiterer Fortzüchtung im grünen Zustande unverändert verharrten. (Vgl. *Schnitzer* und *Munter*, I. Mitt., l. c. S. 115, Versuch 13.)

24\. IV. *Vergleichende Einstellung des grünwachsenden und des hämolytischen Stammes gegen Rivanol und Vuzin in vitro.*

Einsaat: Je 1 Tropfen 1 : 10 Kultur.

*I. Rivanol.*

| Konzentration | Hämolytischer Stamm | Vergrünter Stamm |
|---|---|---|
| 1 : 8 000 | — | 0 |
| 1 : 16 000 | — | 0 |
| 1 : 32 000 | 0 | ++ |
| 1 : 64 000 | 0 | +++ |
| 1 : 128 000 | 0 | — |
| 1 : 256 000 | +++ | — |
| Kontrolle | +++ | +++ |

*II. Vuzin.*

| Konzentration | Hämolytischer Stamm | Vergrünter Stamm |
|---|---|---|
| 1 : 16 000 | — | 0 |
| 1 : 32 000 | 0 | 0 |
| 1 : 64 000 | +++ | +++ |

Dieser Versuch zeigt einerseits die hohe abtötende Wirkung des Rivanols auf den hämolytischen Streptokokkus Ur. Hier wie in den noch zu schildernden Versuchen ist die bactericide Fähigkeit gegenüber frischen Streptokokken recht hoch, wesentlich stärker als die





des Vuzins[1]). *Im grünen Zustande erweist sich jedoch der Stamm als wesentlich resistenter gegen die Einwirkung des Rivanols. Zur Abtötung des grünwachsenden Stammes ist eine 8fach stärkere Konzentration des Mittels erforderlich. Bei der Prüfung der Stämme mit Vuzin treten diese Unterschiede nicht hervor. Der hämolytische wie der grünwachsende Stamm werden von der gleichen Konzentration des Vuzins im Reagensglase abgetötet.*

*Versuch 2. Str. Hi.* wurde am 15. II. aus einer Hautblase bei einem Fall von Dermatitis herpetiformis gezüchtet. Der Stamm wächst auf Blutagar mit zarten, stark hämolytischen Kolonien, in Serumbouillon trübe mit Bodensatz.

17. II. wurden aus der Bauchhöhle einer mit 0,3 ccm einer 1 : 10 000 verdünnten Serumbouillonkultur intraperitoneal infizierten Maus 3 Stunden nach der Infektion spärlich anhämolytische Kolonien gezüchtet, die nach *einer* Blutagarpassage grün wachsen. (Vgl. *Schnitzer* und *Munter*, I. Mitt. l. c. S. 116, Versuch 14.) Bei Fortzüchtung in Serumbouillon und auf Blutagar behält der Stamm den grünen Zustand unverändert bei.

24. II. *Vergleichende Einstellung des grünwachsenden und des hämolytischen Stammes gegen Rivanol und Vuzin in vitro.*

Einsaat: Je 1 Tropfen 1 : 10-Kultur.

*I. Rivanol.*

| Konzentration | Hämolytischer Stamm | Vergrünter Stamm |
|---|---|---|
| 1 : 16 000 | — | 0 |
| 1 : 32 000 | 0 | ++ |
| 1 : 64 000 | 0 | +++ |
| 1 : 128 000 | 0 | — |
| 1 : 256 000 | +++ | — |
| Kontrolle | +++ | +++ |

*II. Vuzin.*

| Konzentration | Hämolytischer Stamm | Vergrünter Stamm |
|---|---|---|
| 1 : 16000 | 0 | 0 |
| 1 : 32000 | 0 | ++ |
| 1 : 64000 | +++ | +++ |

Wie in dem ersten Versuche ist auch hier bei *dem grünwachsenden Stamme eine Abnahme der Empfindlichkeit gegen Rivanol um das 8fache im Vergleich zu dem normal beeinflußten hämolytischen Stamm zu verzeichnen. Auch das Vuzin erweist sich in diesem Versuche dem Stamm im grünen Zustande gegenüber als etwas weniger wirksam. Zur Abtötung*

[1]) Die Beeinflussung der hämolytischen Stämme durch Vuzin ist in diesem und den folgenden Versuchen etwas geringer, als seinerzeit von *Morgenroth* und *Tugendreich* (l. c.) an frischen Streptokokken gefunden wurde. Es dürfte dies damit zusammenhängen, daß jetzt der Eiweißgehalt unserer Nährböden erheblich größer ist, die an Stelle von etwa 17% Ascites 10% Pferdeserum enthalten. Daß derartige frische Streptokokkenstämme *im Tierversuch* vom Vuzin besonders gut beeinflußt werden, hat *Morgenroth* neuerdings beschrieben. (Dtsch. Zeitschr. f. Chirurg. **165**, 1149. 1921.)





***des grünwachsenden Stammes ist eine doppelt stärkere Konzentration erforderlich.***

*Versuch 3. Str. E.* wurde am 11. I. von einem Nasenabstrich bei Diphtherieverdacht gezüchtet; der Stamm bildet auf Blutagar zarte, stark hämolytische Kolonien, in Serumbouillon wächst er klar mit flockigem Bodensatz.

17. II. wird aus der Bauchhöhle einer mit 0,3 ccm einer 1 : 1000 verdünnten Serumbouillonkultur intraperitoneal infizierten Maus *3 Stunden nach der Infektion 1 grüne Kolonie neben 18 hämolytischen Kolonien* gezüchtet. (Vgl. *Schnitzer* und *Munter*, I. Mitt. l. c. S. 113, Versuch 11.)

Diese Kolonie wird auf Blutagar verimpft und weitergezüchtet. Der Stamm behielt monatelang den grünen Zustand unverändert bei, zeigte jedoch die Besonderheit, nach 2—3 Tagen um die grüne Zone einen schmalen hämolytischen Hof zu bilden.

25. II. *Vergleichende Einstellung des grünwachsenden und des hämolytischen Stammes gegen Rivanol und Vuzin in vitro.*

Einsaat: Je 1 Tropfen 1 : 10-Kultur.

*I. Rivanol.*

| Konzentration | Hämolytischer Stamm | Vergrünter Stamm |
|---|---|---|
| 1 : 32 000 | — | 0 |
| 1 : 64 000 | (+) | + |
| 1 : 128 000 | 0 | + |
| 1 : 256 000 | +++ | +++ |
| Kontrolle | +++ | +++ |

*II. Vuzin.*

| Konzentration | Hämolytischer Stamm | Vergrünter Stamm |
|---|---|---|
| 1 : 16 000 | 0 | 0 |
| 1 : 32 000 | 0 | +++ |
| 1 : 64 000 | +++ | +++ |

Dieser Versuch, der im großen und ganzen den vorhergegangenen Versuchen entspricht, *zeigt eine etwas geringere Verminderung der Rivanolempfindlichkeit des vergrünten Str. E.* Bisher war zur Abtötung stets eine recht starke Konzentration von 1 : 16 000 erforderlich gewesen; hier tötet 1 : 32 000 noch völlig ab, bei den Konzentrationen 1 : 64 000 und 1 : 128 000 besteht noch deutliche Hemmung. Die Abimpfung des hämolytischen Stammes zeigt bei der Rivanolkonzentration 1 : 64 000 eine Unregelmäßigkeit geringen Grades; aus dem Röhrchen, das der völlig abtötenden Grenzkonzentration vorausgeht, wuchsen wenige hämolytische Kolonien[1]). *Die Vuzinempfindlichkeit des*

[1]) Impft man aus solchen Bouillonröhrchen, die makroskopisch *kein* Wachstum zeigen, nach weiteren 24 Stunden nochmals ab, so erweisen sie sich als steril. Ob es sich dabei um vorübergehende Festigungserscheinungen handelt, muß dahingestellt bleiben. Versuche, von solchen sprunghaft als Unregelmäßigkeiten innerhalb der Versuche auftretenden Kolonien aus zu spezifisch gefestigten Streptokokkenstämmen zu gelangen, haben bisher lediglich zu dem Ergebnis geführt, daß feste Streptokokken experimentell nicht zu erzeugen sind.



*grünwachsenden Stammes ist hier wieder um die Hälfte geringer als die des hämolytischen Stammes.*

*Versuch 4. Str. Sp.* wurde am 7. II. aus Hydrocelenflüssigkeit gezüchtet. Er bildete auf Blutagar zarte, stark hämolytische Kolonien, in Serumbouillon wuchs er klar mit flockigem Bodensatz.

19. II. wurden aus der Bauchhöhle und der Niere einer mit 0,2 ccm einer 1 : 10 000 verdünnten Serumbouillonkultur intraperitoneal infizierten Maus 4 Stunden nach der Infektion *spärlich grüne Kolonien* gezüchtet. (Vgl. *Schnitzer* und *Munter*, I. Mitt. l. c. S. 114, Versuch 12.) Der so gewonnene und auf Blutagar und in Serumbouillon fortgezüchtete Stamm behielt den grünen Zustand unverändert bei.

24. II. *Vergleichende Einstellung des grünwachsenden und des hämolytischen Stammes gegen Rivanol und Vuzin in vitro.*

Einsaat: Je 1 Tropfen 1 : 10 Kultur.

*I. Rivanol.*

| Konzentration | Hämolytischer Stamm | Vergrünter Stamm |
|---|---|---|
| 1 : 16000 | — | 0 |
| 1 : 32000 | — | +++ |
| 1 : 64000 | 0 | — |
| 1 : 128000 | 10 Kol. | — |
| 1 : 256000 | verunreinigt. Str.? | — |
| 1 : 512000 | +++ | — |
| Kontrolle | +++ | +++ |

*II. Vuzin.*

| Konzentration | Hämolytischer Stamm | Vergrünter Stamm |
|---|---|---|
| 1 : 8000 | 0 | — |
| 1 : 16000 | 2 Kol. | — |
| 1 : 32000 | +++ | 0 |
| 1 : 64000 | — | 0 |
| 1 : 128000 | — | verunreinigt. Str.? |
| 1 : 256000 | — | +++ |

Der Vergleich des hämolytischen und des grünwachsenden Str. Sp. hinsichtlich ihrer Beeinflussung durch Rivanol in vitro ergibt wiederum *die wesentlich (8 mal) geringere Empfindlichkeit des Stammes im grünen Zustande. Dagegen zeigte die Prüfung mit Vuzin hier eine mindestens 4 mal bessere Empfindlichkeit des grünwachsenden Stammes, der noch durch die geringe Konzentration des Vuzins 1 : 64 000 abgetötet wurde.*

*Versuch 5. Str.* 15 wurde am 7. II. aus einem Karbunkel gezüchtet. Der Stamm bildet auf Blutagar zarte Kolonien mit starken hämolytischen Höfen, in Serumbouillon wächst er klar mit flockigem Bodensatz.

17. II. werden aus dem durch Punktion gewonnenen Bauchhöhlenexsudat einer mit 0,3 ccm einer 1 : 100 000 verdünnten Serumbouillonkultur intraperitoneal infizierten Maus 1 Stunde nach der Infektion 10 hämolytische und 2 *grüne Kolonien* gezüchtet. (Vgl. *Schnitzer* und *Munter*, I. Mitt. l. c. S. 112, Versuch 10.) Der so gewonnene grünwachsende Stamm wird auf Blutagar und in Serumbouillon weitergezüchtet und behält seinen grünen Zustand unverändert bei.

24. II. *Vergleichende Einstellung des grünwachsenden und des hämolytischen Stammes gegen Rivanol und Vuzin in vitro.*

Einsaat: Je 1 Tropfen 1 : 10 Kultur.

*I. Rivanol.*

| Konzentration | Hämolytischer Stamm | Vergrünter Stamm |
|---|---|---|
| 1 : 8000 | — | 0 |
| 1 : 16000 | — | 0 |
| 1 : 32000 | 0 | +++ |
| 1 : 64000 | 1 Kol. | — |
| 1 : 128000 | 0 | — |
| 1 : 256000 | +++ | — |
| Kontrolle. | +++ | +++ |

*II. Vuzin.*

| Konzentration | Hämolytischer Stamm | Vergrünter Stamm |
|---|---|---|
| 1 : 16000 | 0 | 0 |
| 1 : 32000 | 4 Kol. | 0 |
| 1 : 64000 | +++ | 0 |
| 1 : 128000 | — | +++ |

Die vergleichende Einstellung des Str. 15 im hämolytischen und grünen Zustande ergibt wieder das schon in den bisher beschriebenen Versuchen beobachtete Verhalten. *Der Stamm wird von Rivanol im grünen Zustande um das 8 fache schlechter beeinflußt als im hämolytischen. Gegen Vuzin izt der grünwachsende Stamm um das Doppelte besser empfindlich.*

Es ergibt sich aus den eben geschilderten Versuchen, daß bei den hämolytischen Streptokokken in Zusammenhang mit derjenigen Änderung ihres normalen Zustandes, die mit Verlust der Virulenz und Verlust der Hämolyse einhergeht und durch das Wachstum mit grüner Verfärbung des Blutagars gekennzeichnet ist, auch die Empfindlichkeit des Stammes gegenüber spezifischen chemotherapeutischen Agenzien weitgehend verändert wird. Insbesondere ist die Resistenz gegen das Rivanol bei Streptokokken im grünen Zustande erheblich vermehrt. Beim Vuzin zeigt sich ein abweichendes Verhalten, indem hier die Streptokokken im grünen Zustande, verglichen mit den entsprechenden hämolytischen Stämmen, gleich, schlechter und besser beeinflußt werden können. Dies grundsätzlich verschiedene Verhalten der Empfindlichkeit vergrünter Streptokokken gegen Rivanol und Vuzin haben wir in der folgenden Tabelle dargestellt. In ihr sind für die einzelnen hier untersuchten Streptokokkenstämme die Werte für die abtötenden Konzentrationen eingetragen und für Rivanol und Vuzin das Verhältnis

$$\frac{\text{abtötende Konzentration beim hämolytischen Stamm}}{\text{abtötende Konzentration beim vergrünten Stamm}} = \textit{Empfindlichkeitsquotient des grünwachsenden Stammes}$$

angegeben.

*Übersichtstabelle über die Empfindlichkeit von Streptokokken im hämolytischen und grünen Zustand gegen Rivanol und Vuzin im Reagensglasversuch.*

| Strepto-kokken-Stamm | Abtötender Grenzwert des Rivanols | | Empfindlichkeits-quotient | Abtötend. Grenzwert des Vuzins | | Empfindlichkeits-quotient |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | hämolytischer Stamm | vergrünter Stamm | | hämolytischer Stamm | Vergrünter Stamm | |
| Str. Ur. | 1 : 128 000 | 1 : 16 000 | 1/8 | 1 : 32 000 | 1 : 32 000 | 1/1 |
| Str. Hi. | 1 : 128 000 | 1 : 16 000 | 1/8 | 1 : 32 000 | 1 : 16 000 | 1/2 |
| Str. E. | 1 : 128 000 | 1 : 32 000 | 1/4 | 1 : 32 000 | 1 : 16 000 | 1/2 |
| Str. Sp. | 1 : 128 000 | 1 : 16 000 | 1/8 | 1 : 16 000 | 1 : 64 000 | 4/1 |
| Str. 15 | 1 : 128 000 | 1 : 16 000 | 1/8 | 1 : 32 000 | 1 : 64 000 | 2/1 |

*Zusammenfassung.*

Die fünf ausführlich geschilderten Versuche an verschiedenen Streptokokkenstämmen zeigen, daß die „Vergrünung" frischer hämolytischer Streptokokken, welche in vitro normale Empfindlichkeit gegenüber dem Rivanol besitzen, offenbar in der Regel eine erhebliche Verminderung der Empfindlichkeit zur Folge hat. Zur Abtötung der vergrünten Streptokokken ist unter den gleichen Versuchsbedingungen das 4- bis 8fache derjenigen Rivanolkonzentration nötig, welche die hämolytischen Streptokokkenstämme abtötet.

Ganz anders stellt sich das Verhalten des Vuzins dar; hier bleibt in einem Falle die Empfindlichkeit gleich, in 2 Fällen sinkt sie auf die Hälfte und steigt bei 2 anderen Stämmen um das 2fache, sogar um das 4fache.

Es kann sich also nicht etwa um eine allgemeine Resistenzveränderung handeln, vielmehr tritt zwei spezifischen chemotherapeutischen Agenzien gegenüber ein abweichendes Verhalten in Erscheinung.

Welche Bedeutung den „vergrünten" und in ihrer Virulenz verminderten Streptokokken in der Pathologie menschlicher Infektionen zukommt, darüber ist bis jetzt nichts bekannt. In rein praktischer Hinsicht ist zu fordern, daß unter allen Umständen zur örtlichen Antisepsis solche Konzentrationen chemotherapeutischer Agenzien verwendet werden, welche in ihrer Wirksamkeit auch etwaige resistentere Modifikationen umfassen. Die bisherigen klinischen Erfahrungen bieten zwar keinen Anhaltspunkt für deren Auftreten beim Menschen, unsere Beobachtungen müssen aber Veranlassung geben, unerwartete Fehlschläge bei der klinischen Anwendung in der durch unsere Versuche vorgeschriebenen Richtung zu analysieren. Jedenfalls geht aus ihnen die Bedeutung vertiefter biologischer Studien für die experimentelle Begründung der chemotherapeutischen Antisepsis zur Genüge hervor.



(Aus der Abteilung für Chemotherapie des Instituts für Infektionskrankheiten „Robert Koch".)

# Über die Konservierung von Streptokokken und die Erhaltung ihrer Tierpathogenität nach dem Ungermannschen Verfahren.

Von
**Fritz Pulvermacher.**

Experimentelle Arbeiten mit Streptokokken, wie sie seit längerer Zeit in unserem Laboratorium ausgeführt werden[1]), veranlaßten ein eingehenderes Studium der Pathogenität zahlreicher Streptokokkenstämme mit dem Ziele, möglichst regelmäßige Infektionen verschiedener Art zu erreichen.

In der Regel wurden die Streptokokken in 1- bis höchstens 2tägigem Turnus von Blutagarplatten mit einem Zusatz von 8% defibriniertem Ziegen- oder Pferdeblut in 10proz. Pferdeserumbouillon und wieder auf Blutagar überimpft. Die Einschaltung der Blutagarpassage zwischen die flüssigen Nährmedien geschieht, um die Reinheit der Kultur zu kontrollieren und bei den hämolytischen Stämmen etwa abgespaltene grüne Kolonien zu erkennen.

Die Pathogenität der Streptokokken wird auf solche Weise eine gewisse Zeit hindurch nicht verändert. Man kann damit rechnen, daß die Pathogenität für Mäuse sich 4—6 Wochen hindurch unverändert erhält. Wir haben eine Anzahl Streptokokken bei dieser Art der Fortzüchtung 4—5 Monate, z. T. fast 1 Jahr hindurch zur Erzeugung der subcutanen Streptokokkenphlegmone bei der Maus benutzen können. Selbstverständlich mußte hierbei durch fortlaufende Kontrollversuche die wirksame Dosis sorgfältig kontrolliert und dem allmählichen Sin-

[1]) *Morgenroth* und *Bumke*, Dtsch. med. Wochenschr. 1914, S. 538. — *Morgenroth* und *Tugendreich*, Berl. klin. Wochenschr. 1916, Nr. 29; Biochem. Zeitschr. **79**, 257. 1917. — *Morgenroth*, Dtsch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 19. — *Morgenroth* und *Abraham*, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 3. — *Morgenroth*, Dtsch. Zeitschr. f. Chirurg. **165**, 149. 1921. — *Morgenroth*, *Schnitzer* und *Rosenberg*, Dtsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 44. — *Morgenroth*, Klin. Wochenschr. 1922, S. 353. — *Morgenroth*, *Biberstein* und *Schnitzer*, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 13. — *Schnitzer* und *v. Kühlewein*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **92**, 492. 1921. — *Schnitzer* und *Munter*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **93**, 96. 1921 und **94**, 107. 1921. — *Morgenroth* und *Abraham*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **94**, 163. 1921.



ken der Pathogenität, wie es im Laufe der Monate regelmäßig in die Erscheinung trat, durch entsprechende Erhöhung der Infektionsdosis Rechnung getragen werden. Gelegentlich kommt es nach längerer Fortzüchtung bei 1- bis 2tägiger Überimpfung vor, daß ein Stamm seine Pathogenität völlig verliert. Auch die Weiterimpfung von Serumbouillon in Serumbouillon ohne Blutagarpassage bietet, wie wir in besonderen Versuchen festgestellt haben, keine größere Sicherheit bezüglich der Erhaltung der Virulenz. Da frische Streptokokken immer zur Verfügung stehen und sich nach unseren Erfahrungen an etwa 150 Stämmen ohne Ausnahme zur Erzeugung typischer Phlegmonen bei Mäusen eignen[1]), tut man am besten, die älteren Stämme rechtzeitig auszuschalten und durch frische zu ersetzen.

Das Verfahren der Fortzüchtung der Streptokokken auf defibriniertem Menschenvollblut nach *Meyer* und *Ruppel* wurde anfangs mit gutem Erfolge angewandt. *Morgenroth*, *Biberstein* und *Schnitzer* (l. c.) haben auf diese Weise die — an sich nicht hohe — Virulenz des Streptokokkus 23 längere Zeit konstant erhalten können ohne eine Abschwächung, allerdings auch ohne eine Erhöhung der tierpathogenen Eigenschaften des Stammes zu verzeichnen. Wir mußten später von dieser Methode abgehen, ohne sie an vielen Streptokokkenstämmen systematisch geprüft zu haben, da uns bei der Ausdehnung der Versuche Menschenblut nicht in den nötigen Mengen zur Verfügung stand.

Wir haben fernerhin versucht, durch häufige Mäusepassagen den Virulenzgrad frischer, vom Menschen gezüchteter Streptokokken konstant zu erhalten. Da über das Verhalten derartiger Stämme bei fortlaufenden Tierpassagen bisher nur wenig bekannt ist, eine erhebliche Virulenzsteigerung bei diesem Verfahren nicht regelmäßig zu erwarten war, konnte die Möglichkeit einer gewissen Virulenzerhaltung immerhin in Betracht gezogen werden. Die Versuche zeigten nun, daß durch Tierpassagen der ursprüngliche pathogene Charakter eines hämolytischen Streptokokkus im wesentlichen unverändert bleibt, daß vor allem eine Wiederherstellung oder Steigerung der Pathogenität bei den in Abschwächung begriffenen Stämmen nicht zu erzielen ist.

So konnten wir bei dem von *Morgenroth* bereits beschriebenen hämolytischen Streptokokkus 23 auch durch systematisch wiederholte Tierpassagen keine Erhöhung der ursprünglichen geringen Virulenz für weiße Mäuse erzielen, und das von *Schnitzer* und *v. Kühlewein* (l. c.) beschriebene völlige Erlöschen der Virulenz ließ sich bei diesem Stamm nicht aufhalten.

Ähnliche Beobachtungen machten wir bei dem Str.Bl., der von einer Meningitis gezüchtet war. Dies war ein für Mäuse hochvirulenter, hämolytischer Stamm, den wir fortlaufend durch regelmäßige Verimp-

[1]) Vgl. *Fritz Pulvermacher*, Inaug.-Diss. Berlin 1922.



fung des Herzblutes von Maus zu Maus weiterführten. Von einer nach der 17. Tierpassage angelegten Serumbouillonkultur töteten bei intraperitonealer Verimpfung 0,5 ccm einer Verdünnung von 1 : 1 Million Mäuse in 24 Stunden. Auf dieser Virulenzstufe hielt sich der Stamm bei der gewöhnlichen, oben geschilderten Überimpfung etwa 5 Wochen. Dann nahm seine Virulenz ab — 0,5 ccm einer Verdünnung 1 : 100 töteten Mäuse nicht mehr —, und weitere Tierpassagen konnten sie nicht wieder auf die alte Höhe bringen, ja nicht einmal die fortschreitende Abschwächung aufhalten. Nach der 40. Mäusepassage war die tödliche Dosis auf 0,5 ccm einer 1 : 10 verdünnten Serumbouillonkultur gesunken, und selbst der Erfolg dieser hohen Dosis war nicht mehr ganz regelmäßig.

Bei hochvirulenten, für Mäuse angezüchteten Laboratoriumsstämmen ist es möglich, durch Tierpassagen geringe Virulenzschwankungen auszugleichen.

Das von *Ungermann*[1]) für die Konservierung empfindlicher Bakterien, vor allem der Meningokokken und Gonokokken angegebene Verfahren bot uns die Möglichkeit, Streptokokken jeden Virulenzgrades beliebig lange unter Erhaltung ihrer ursprünglichen Eigenschaften aufzubewahren. *Ungermann* hielt Meningokokken und Gonokokken in verdünntem oder unverdünntem inaktivem Kaninchenserum unter Luftabschluß durch flüssiges Paraffin und konnte auf diese Weise sowohl alte Laboratoriumskulturen als auch frisch vom Menschen gewonnene Stämme monatelang, einzelne sogar länger als ein Jahr lebensfähig und virulent erhalten; dabei bewährte sich das unverdünnte Serum am besten. Seine Versuche, Pneumokokken und Streptokokken in Serum zu konservieren, zeigten, daß es gleichfalls möglich ist, diese Keime monatelang, auch bei dauernder Bebrütung, überimpfbar zu halten. Die Tierpathogenität der Pneumokokken wie der Streptokokken ging nicht verloren, wenn auch bei den letzteren eine Abschwächung der 6 Wochen alten Kultur zu verzeichnen war[2]).

Wir sind bei der Verwendung der Serummethode nach *Ungermann* dazu übergegangen, statt des Kaninchenserums das uns stets zugängliche Pferdeserum zu benutzen, das gleichfalls 1 Stunde bei 60° C inaktiviert wird. Nach *Ungermanns* Vorschrift füllen wir dann je 1 ccm dieses Serums in enge Reagensgläser (Uhlenhuthröhrchen), überschichten mit 0,2—0,3 ccm sterilen, flüssigen Paraffins und sterilisieren die fertigen, mit Wattestopfen verschlossenen Röhrchen noch-

[1]) *Ungermann*, Arb. a. d. Reichs-Gesundheitsamt **51**. 180. 1919.

[2]) Die Methode *Neufelds* (Eintrocknung der Organe infizierter Tiere im Exsiccator), die sich uns für Pneumokokken seit Jahren bewährt hat, ist von *Neufeld* selbst mit Erfolg auch auf *Streptokokken* angewandt worden. (S. Neufeld-Haendel, Handb. v. Kolle-Wassermann **4**, 524.)



mals 1 Stunde bei 60° C im Brutschrank nach. Am Schlusse dieses Prozesses bringen wir — was von *Ungermann* noch nicht angegeben ist — durch kurzen Aufenthalt der Röhrchen im Wasserbad bei 70° C das Serum in einen gallertigen Zustand und bewahren die Röhrchen im Eisschrank auf. Die Beimpfung erfolgt mit langen Glascapillaren, und zwar übertragen wir immer reichliche Mengen einer dichten Verreibung von Oberflächenkultur von Blutagar oder einer Serumbouillonkultur in das Serum und bewahren nach 24stündigem Aufenthalt bei 37° C die Röhrchen bei Zimmertemperatur im Dunkeln auf. Die Streptokokken zeigen in dem gallertig gewordenen Serum ein Wachstum, das an das Verhalten in Stichkulturen erinnert; doch erscheint das Wachstum mehr bandartig; oft sieht man mehrere kulissenartig angeordnete Bänder zarter Streptokokkenkolonien. Die Entnahme aus diesen Serumröhrchen erfolgt gleichfalls mit Glascapillaren, mit denen kleine Mengen auf Blutagar und Serumbouillon übertragen werden.

Bei der Konservierung nach *Ungermann* hielten sich die von uns untersuchten hämolytischen Streptokokkenstämme längere Zeit lebensfähig und — was von größter Bedeutung ist — auch in ihrer Tierpathogenität unverändert. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, alle 6—8 Wochen die Keime in frische Röhrchen zu übertragen. Wir schalten bei dieser Gelegenheit stets eine Blutagarpassage dazwischen. Etwaige Virulenzprüfungen werden mit einer Serumbouillonkultur vorgenommen, welche von dieser Blutagarplatte erhalten worden ist.

Wir haben nun die Beobachtung gemacht, daß einzelne Stämme ohne jede Überimpfung sich ganz besonders lange lebensfähig und virulent erhalten, und zwar konnten wir diese von *Ungermann* (l. c.) bereits erwähnte Tatsache an zwei für Mäuse hochpathogenen Laboratoriumsstämmen von Streptococcus haemolyticus bestätigen.

I. Streptokokkus $H_2$. Hochvirulenter, durch Mäusepassage[1]) gegangener Laboratoriumsstamm, der uns im Juni 1920 von dem Laboratorium der Höchster Farbwerke freundlichst überlassen wurde. Dieser Streptokokkus tötete Mäuse bei intraperitonealer Infektion noch durch 0,3 ccm einer Verdünnung von 1 : 10 Millionen einer 24stündigen Serumbouillonkultur binnen 48 Stunden; 1 : 100 Millionen ging nur gelegentlich bei einzelnen Tieren an. Der Stamm wurde auf Serum verimpft und aufgehoben.

Am 8. IX. 21 wurden zwei von derartigen, 14 bzw. 12 Monate in Serumröhrchen gehaltenen Kulturen des Streptokokkus $H_2$ auf Blutagar abgeimpft. Sie wuchsen noch reichlich und waren stark hämo-

[1]) Die Angabe von *Schnitzer* und *Munter* (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **94**, 108), daß dieser Stamm keine Tierpassage durchgemacht habe, wird hiermit auf Grund neuerlicher Informationen durch Herrn Dr. *Joseph*, Leiter des bakteriologischen Laboratoriums der Höchster Farbwerke, richtig gestellt.



lytisch. Am 9. IX. wurden sie in Serumbouillon weiter verimpft und die Virulenz der 24stündigen Serumbouillonkultur bei intraperitonealer Infektion von Mäusen ermittelt. Das Ergebnis dieser Virulenzeinstellung zeigt Tabelle I, in der die Pathogenität des Ursprungsstammes im Juni 1920 vor seiner Konservierung zum Vergleich mit aufgeführt ist.

*Tabelle I*

| Stamm | Dauer der Aufbewahrung im Serum | Infektion intraperit. mit je 0,8 ccm der Verdünnungen | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1:100000 | 1:1 Mill. | 1:10 Mill. |
| Ausgangsstamm im Juni 1920 vor der Konservierung | — | † 2. Tag | † 2. Tag | † 2. Tag |
| Konservierte Stämme a) | 12 Monate | † 2. Tag | † 2. Tag | † 3. Tag |
| b) | 14 Monate | † 2. Tag | † 2. Tag | † 3. Tag |

Streptokokkus $H_2$ hat also seine Virulenz über ein Jahr lang im Serumröhrchen unverändert bewahrt.

II. Streptokokkus Aronson. Versuche mit dem gleichfalls für Mäuse hochpathogenen, früher vielfach durch Mäuse gegangenen Streptokokkus Aronson zeigten, daß die in dem zuerst im Juli 1920 beimpften Serumröhrchen befindlichen Keime ebenfalls über ein Jahr lang ihre hohe Virulenz für Mäuse unverändert bewahrt hatten. Im März 1922, d. h. ungefähr $1^3/_4$ Jahre nach der Beimpfung, war jedoch kein Wachstum von Streptokokken aus diesem Röhrchen mehr zu erzielen. Nun war aber am 2. VII. 1921 von dem ersten Serumröhrchen auf ein anderes übertragen worden; von diesem zweiten Ungermannröhrchen impften wir am 24. IV. 1922 auf Blutagar und Serumbouillon ab. Es wuchsen auf Blutagar reichlich zarte hämolytische Kolonien, das Wachstum in Serumbouillon war trübe mit geringem Bodensatz wie stets bei diesem Stamm. Eine Virulenzeinstellung der frisch von Serum gewonnenen 24stündigen Serumbouillonkultur bei intraperitonealer Infektion hatte das in Tabelle II dargelegte Ergebnis. Wir finden dort die Virulenz des Ausgangsstammes im Juli 1920 der des Ungermannstammes gegenübergestellt.

*Tabelle II.*

| Stamm | Infektion mit 0,5 ccm intraperit. der Verdünnungen | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 1:10000 | 1:100000 | 1:1 Mill. | 1:10 Mill. |
| Ausgangsstamm im Juli 1920 vor der Konservierung | — | † 2. Tag | — | † 3. Tag |
| Konservierter Stamm | † 2. Tag | † 1. Tag | † 4. Tag | — |



Wie aus der vorstehenden Tabelle ersichtlich, hatte sich die Pathogenität des Streptokokkus Aronson seit dem Juli 1920 nicht wesentlich verändert.

Auch dieser Stamm hat sich mithin im Serum mindestens $^3/_4$ Jahr virulent erhalten; nach fast 2jährigem Aufenthalte in einem Ungermannröhrchen war jedoch die Lebensfähigkeit der Keime erloschen.

Bei den *frisch vom Menschen gezüchteten hämolytischen Streptokokkenstämmen* gelingt es nicht immer, Überimpfbarkeit und Virulenz so lange zu erhalten, wie bei den an lange Fortzüchtung schon gewöhnten Laboratoriumsstämmen. Frische hämolytische Streptokokken halten sich, wie wir in zahlreichen Fällen beobachtet haben, nur ungefähr 6—8 Monate lebensfähig. Nach einem Jahre gingen sie bei Übertragung aus dem Serumröhrchen auf Blutagar nicht mehr an. Um sicher zu gehen, ist es daher notwendig, *solche Stämme in den obengenannten Abständen von 6—8 Wochen zu überimpfen.*

Wir geben im folgenden ein Beispiel dafür, wie schnell frisch vom Menschen gezüchtete hämolytische Streptokokken bei der üblichen Fortzüchtung ihre pathogenen Eigenschaften verändern können, und zeigen gleichzeitig, daß sich die ursprüngliche Pathogenität bei der Konservierung in Serum konstant erhalten läßt.

Es handelt sich um den Streptokokkus 19, der auch in anderer Hinsicht von Interesse ist. Er war aus Urin gezüchtet worden und ging uns als völlig avirulenter, grünwachsender Stamm zu. Ein bald nach seiner Gewinnung angelegtes Serumröhrchen wurde 20 Tage darauf abgeimpft. Es wuchsen nur spärliche grüne Kolonien. Der von diesen Keimen weitergezüchtete Stamm schlägt nach 4—5 maliger Überimpfung in den hämolytischen Zustand um, und der von hämolytischen Einzelkolonien fortgezüchtete Stamm spaltet bei fraktionierter Aussaat keine grünen Kolonien mehr ab. Die tödliche Dosis dieses hämolytischen Stammes war 0,3 ccm $^1/_{1000}$ Kultur bei intraperitonealer Infektion; noch 0,2 ccm $^1/_{10000}$ 24stündiger Serumbouillonkultur subcutan am Mäusebauch eingespritzt, erzeugten nach 24 Stunden Phlegmonen. Mit größeren Dosen — 0,2 ccm $^1/_{400}$; 0,2 ccm $^1/_{200}$ — gelang es, Phlegmonen zu erzeugen, die noch nach 6—8 Tagen bestanden. Am 7. IV. wurde vom hämolytischen Streptokokkus 19 ein Serumröhrchen nach *Ungermann* angelegt, davon wurde am 17. IV. auf Blutagar und Serumbouillon abgeimpft und in der Folgezeit der Stamm zu zahlreichen Tierversuchen benutzt. Am 19. IV. wurden 5 Mäuse mit 0,2 ccm $^1/_{250}$ Kultur des Streptokokkus 19 subcutan am Bauche infiziert; 3 von diesen nach 18 Stunden getöteten Mäusen hatten schon ausgedehnte Phlegmonen, aus denen dichteste Rasen hämolytischer Streptokokken wuchsen. Zwei Mäuse, die nach 6 Tagen getötet wurden, boten das gleiche Bild. Der Stamm wurde in dem üblichen Turnus vom festen



zum flüssigen Nährboden fortgezüchtet und etwa 14 Tage später nochmals in derselben Dosis — 0,2 $^1/_{250}$ — 4 Mäusen subcutan am Bauche eingespritzt; diese Tiere wurden nach 24 Stunden getötet; nur 2 von ihnen zeigten eine deutliche Phlegmone. Das Ergebnis der Abimpfung des Subcutangewebes auf Blutagar ist in der Tabelle III wiedergegeben.

*Tabelle III.*

| Nr. | Anatomischer Befund. | Bakteriologischer Befund. |
|---|---|---|
| Maus 1 | Phlegmone | +++[1]) |
| „ 2 | Phlegmone | ++(+) |
| „ 3 | Keine Phlegmone | (+) |
| „ 4 | Keine Phlegmone | 3 Kol. |

Der Stamm ging jetzt recht unregelmäßig an, war also durch die Fortzüchtung deutlich abgeschwächt. Wir entnahmen deshalb noch einmal dem am 7. IV. beimpften Serum Material und legten Kulturen auf Blutagar und in Serumbouillon an, die gut angingen. Auf Blutagar wuchsen reichlich hämolytische Kolonien. Mit der 24stündigen Serumbouillonkultur wurden Mäuse infiziert, und zwar erhielten 2 Tiere je 0,2 ccm $^1/_{250}$ und 2 weitere je 0,2 $^1/_{500}$ 24stündiger Serumbouillonkultur subcutan am Bauche. Nach 24 Stunden getötet und seziert boten die 4 Mäuse stark entwickelte Phlegmonen der Bauchdecken dar; bei der Abimpfung auf Blutagar wuchsen dichteste Rasen hämolytischer Kolonien.

Während die Tierpathogenität der in üblicher Weise 16 Tage hindurch fortgezüchteten Kultur des hämolytischen Streptokokkus 19 deutlich abgeschwächt war, hatte sie sich bei den in Serum nach *Ungermann* aufbewahrten Keimen voll erhalten lassen.

Von der Dauer der Konservierungsmöglichkeit in Ungermannröhrchen geben uns Untersuchungen an dem hämolytischen Streptokokkus *Re* ein Bild, das wir nach unseren Erfahrungen als charakteristisch für das Verhalten frischer hämolytischer Menschenstämme bei dem Verweilen in Serum ansehen können.

Streptokokkus Re., Ende Januar 1921 aus einer Phlegmone gezüchtet, wächst in Serumbouillon diffus trübe mit geringem Bodensatz, auf Blutagar bildet er zarte Kolonien mit starken hämolytischen Höfen. Bei einer intraperitonealen Virulenzeinstellung töteten 0,3 ccm einer 1 : 100 verdünnten Serumbouillonkultur Mäuse nach 24 Stunden, wobei eine untere Grenze nicht erreicht wurde. Bei subcutaner Einspritzung am Bauche erzeugen 0,2 ccm einer 1 : 100 verdünnten Serumbouillonkultur eine Phlegmone, aus der ein dichter Rasen hämolytischer Streptokokken wächst. Am 10. II. 1921 wurde der Strep-

[1]) +++ bedeutet dichtester Rasen konfluierter Kolonien, ++ dichter Rasen gut trennbarer Kolonien, (+) wenige Kolonien (bis 50) hämolytischer Streptokokken.



tokokkus Re in ein Serumröhrchen abgeimpft (I), von dem am 5. X. 1921 in neues Serum übertragen wurde (II). Von diesem zweiten Röhrchen wurde am 29. XII. 1921 ein drittes beimpft. Am 28. IV. 1922 wurden aus den 3 Röhrchen Kulturen in Serumbouillon und auf Blutagar angelegt; über ihr Wachstum gibt Tabelle IV Auskunft.

*Tabelle IV.*

| Stamm | Dauer des Aufenthaltes im Serum | Wachstum | |
|---|---|---|---|
| | | auf Blutagar | in Serumbouillon |
| Re I | etwa 14 Monate | unbewachsen | unbewachsen |
| Re II | etwa 7 Monate | hämolyt. Kolon. | trübe m. Bodensatz |
| Re III | 4 Monate | hämolyt. Kolon. | trübe m. Bodensatz |

Es wurde bei den beiden 7 und 4 Monate konservierten Stämmen das Verhalten der Tierpathogenität untersucht; und zwar haben wir uns zur Prüfung der subcutanen Infektion bedient, da für die frischen Menschenstämme das Angehen im Subcutangewebe der Maus unter Bildung einer subcutanen Phlegmone besonders charakteristisch ist und ein gutes Bild von dem Verhalten der tierpathogenen Eigenschaften gibt.

Von 24stündigen Serumbouillonkulturen der beiden Stämme II und III werden mit steriler Bouillon Verdünnungen 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000 hergestellt und von einer jeden 0,2 ccm je einer Maus subcutan am Bauche eingespritzt. Nach etwa 48 Stunden werden alle Mäuse durch Chloroform getötet und sofort seziert; es wird vom Subcutangewebe auf Blutagar abgeimpft. Das Ergebnis ist aus der folgenden Tabelle V zu ersehen.

*Tabelle V.*

| Infektionsdosis: 0,2 ccm der Verdünnungen | *Re II* | | *Re III* | |
|---|---|---|---|---|
| | Anatom. Befund | auf Blutagar | Anatom. Befund | auf Blutagar |
| 1 : 10 | Phlegmone | +++ | Phlegmone | +++ |
| 1 : 100 | Phlegmone | +++ | Phlegmone | +++ |
| 1 : 1000 | Phlegmone | +++ | Phlegmone | +++ |
| 1 : 10 000 | Keine Phlegmone | 0 | Spur Phlegmone | +++ |

Die Untersuchungen am Streptokokkus Re zeigen zunächst, daß der frisch von einer menschlichen Erkrankung gezüchtete hämolytische Stamm nach mehr als einjährigem Aufenthalt in Serum seine Überimpfbarkeit eingebüßt hatte. Dagegen gingen Keime, die über ein Halbjahr und länger als ein Vierteljahr in Serumröhrchen gehalten waren, bei Übertragung auf unsere üblichen Nährböden noch reichlich an und waren tierpathogen. Gegenüber dem letzten und jüngsten Stamme III ist die Tierpathogenität des älteren (II) etwas abgeschwächt; die zur Erzeugung einer Phlegmone ausreichende Dosis ist mindestens um das Zehnfache höher. Eine völlige Vergleichsmöglichkeit mit dem Verhalten des im Januar 1921 gewonnenen Ursprungsstammes haben



wir nicht, da wir seinerzeit den Stamm nur bis zu einer Kulturverdünnung 1 : 100 eingestellt hatten; nach unseren Erfahrungen an frischen Streptokokken ist aber nicht anzunehmen, daß der Stamm wesentlich höher pathogen gewesen ist, als er sich heute nach der Konservierung uns darstellt.

*Die beiden letzten angeführten Beispiele ließen deutlich den Wert des Serumverfahrens für die Konservierung frischer Streptokokken, aber auch die Grenze, die dieser Methode für die Erhaltung der Lebensfähigkeit der Keime durch die Zeit gesteckt ist, erkennen.* Welch große Erleichterung des experimentellen Arbeitens mit Streptokokken *Ungermann* geschaffen hat, liegt mithin auf der Hand.

Wir müssen jedoch darauf hinweisen, daß *die bisher mitgeteilten Tatsachen nur für hämolytische Streptokokken Geltung haben.*

Untersuchungen, die wir an grünwachsenden Streptokokken — sowohl an solchen, die direkt vom Menschen gezüchtet waren, als auch an experimentell nach der von *Schnitzer* und *Munter* (l. c.) angegebenen Methode vergrünten hämolytischen Streptokokken — angestellt haben, zeigten, daß manche derartige Stämme sich nur sehr kurze Zeit nach *Ungermann* konservieren lassen. Es sei hier nur kurz über eine Versuchsreihe (Tabelle VI) berichtet, in der ungefähr gleichaltrige Serumkulturen von hämolytischen und grünwachsenden Streptokokken, die sämtlich frisch aus menschlichen Erkrankungen gezüchtet waren, auf ihre Lebensfähigkeit geprüft wurden. Die Stämme wurden gleichzeitig vom Serum auf Blutagar und Serumbouillon verimpft.

*Tabelle VI.*

| | Hämolyt. Streptokokken | | Grünwachs. Streptokokken | |
|---|---|---|---|---|
| Aufenthalt der Stämme im Serum | Stamm | Wachstum | Stamm | Wachstum |
| 95 Tage | Str. 10 | üppig | Str. 7 | 0 |
| 54 Tage | Str. 29 | üppig | Str. 28 | 0 |
| 12 Tage | Str. 44 | üppig | Str. 48 | spärlich |

Während also, entsprechend unseren früheren Angaben, hämolytische Streptokokken noch nach 95 Tagen und ebenso nach 50 und weniger Tagen von Serum auf Blutagar oder Serumbouillon verimpft üppig angingen, war die Lebensfähigkeit der gleichalten grünwachsenden Stämme bereits erloschen und selbst in der 12 Tage alten Kultur des Streptokokkus 48 schon deutlich vermindert. Doch müssen wir ausdrücklich feststellen, daß es auch grüne Stämme gibt, bei denen die Wirkung der *Ungermann*schen Methode eine bessere ist. Wir haben neuerdings solche Streptokokken 2 Monate hindurch in Ungermannserum ihre Lebensfähigkeit bewahren sehen.

Wir konnten hier natürlich nur charakteristische Beispiele aus unserem sehr reichen Material geben.





Die Gesamtheit unserer Erfahrungen läßt sich in folgenden Sätzen zusammenfassen:

1. Hämolytische Streptokokken können in Serumröhrchen nach *Ungermann* längere Zeit lebensfähig und in ihrer Tierpathogenität sowohl in bezug auf die Dosis letalis wie in bezug auf die Erzeugung subcutaner Phlegmonen unverändert erhalten werden.

2. Für Mäuse hochvirulente, durch mehrfache Mäusepassagen gegangene Laboratoriumsstämme bleiben länger als ein Jahr quantitativ vollvirulent.

3. Frisch vom Menschen gezüchtete hämolytische Streptokokken bewahren ungefähr 6—8 Monate voll ihre pathogenen Eigenschaften. Um sicher zu gehen, empfehlen wir Überimpfung auf Blutagar und erneute Beschickung von Ungermannröhren alle 2 Monate.

4. Nichthämolytische, grünwachsende Streptokokken werden nicht regelmäßig 2 Monate hindurch lebend erhalten.

5. Die Ungermannmethode leistet erheblich mehr als die dauernde Fortzüchtung für die Konservierung der Streptokokken und bietet dabei den Vorteil größter Ersparnis an Nährboden und Arbeit.





(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Freiburg i. Br. [Dir. Prof. *Hahn*].)

# Salvarsanwirkungen.
## Nach Untersuchungen an der experimentellen Staphylokokkeninfektion des Kaninchens.

Von
**Dr. Shin Maïe** (Tokio).

Die Frage nach der Wirkungsweise des Salvarsans ist immer noch ungeklärt, obwohl sie Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen ist. Wir besitzen bis jetzt keine sicheren Anhaltspunkte dafür, ob diese Wirkung eine direkt bactericide ist oder ob der günstige Einfluß des Salvarsans auf einer indirekten Stimulierung der Schutzstoffbildung beruht. Während die Vornahme und Deutung von Versuchen nach dieser Richtung gerade mit den Erregern, gegen welche das Salvarsan die intensivste Wirkung entfaltet, nämlich mit Trypanosomen und Spirochäten, aus den verschiedensten bekannten Gründen große Schwierigkeiten bereitet, ist die Auslegung der an bakteriellen Infektionen vorgenommenen Untersuchungen mit dem Salvarsan eine einfachere und sicherere. Vielleicht wäre man auf letzterem Wege schon zu einem endgültigen Ergebnis gelangt, wenn es eine bakterielle Infektionskrankheit gäbe, gegen die das Salvarsan volle Heilwirkung besitzt. Selbst aber beim Milzbrand und beim Rotlauf, den einzigen bakteriellen Infektionen, bei denen gelegentliche Heilerfolge des Salvarsans anscheinend nicht zu bestreiten sind, kann man derartige günstige Wirkungen höchstens als Ausnahmen bezeichnen. Während also das Salvarsan bei den bakteriellen Infektionen im Tierkörper in der Regel versagt, entfaltet es in vitro — wie das namentlich aus den Versuchen von *Schiemann*[1]) hervorgeht — beispielsweise gegenüber Milzbrandbacillen eine zwar nur langsam, aber doch deutlich in Erscheinung tretende Entwicklungshemmung, die unter anderem noch bei einer Salvarsankonzentration von 1:300 000 und 24stündiger Einwirkung auftrat. Diese Tatsache der entwicklungshemmenden Wirkung des Salvarsans, die bei Serumgegenwart eher gesteigert als abgeschwächt wird (*Roos*[2]), *Schiemann*), ist für die Deutung der Salvarsanwirkung aber von größter Bedeutung. Wir dürfen das Versagen des Salvarsans bei Infektionen mit solchen Erregern, gegen die es in vitro entwicklungshemmende Wirkung zeigt, einstweilen darauf zurückführen, daß die auch im Tierkörper durch das Salvarsan zu erwartende Schädigung der Erreger doch nicht genügt, um unter Mithilfe der Schutzeinrichtungen des Tierkörpers zur vollständigen Vernichtung zu führen.





Kürzlich hat nun *Völckers*[3]) in Untersuchungen bei einer anderen bakteriellen Infektion, nämlich bei *der künstlichen Staphylokokkeninfektion des Kaninchens experimentelle Untersuchungen über den Einfluß des Salvarsans* auf den Krankheitsverlauf angestellt und entsprechend früheren klinischen Beobachtungen in der Mehrzahl der Fälle *ein völliges Versagen dieses Mittels* festgestellt. Zwar wurde gelegentlich eine gewisse Beeinflussung der Allgemeininfektion beobachtet, aber diese war so geringfügig, daß ihr irgendeine praktische Bedeutung nicht beigemessen werden konnte. *Bei gleichzeitiger Infektion und Salvarsaninfektion trat sogar eine akute Verschlimmerung des Krankheitszustandes ein*, die im Tierversuche *innerhalb kürzester Frist unter schweren Intoxikationserscheinungen zum Tode* führte.

Wir haben nun auf Grund dieser Beobachtungen zur Analyse der Salvarsanwirkung bei der Staphylokokkeninfektion des Kaninchens einige Untersuchungen angestellt, weil gerade die experimentelle Staphylokokkeninfektion in den Mechanismus der Infektion mit einfachen Mitteln einen Einblick gestattet, durch den auch Aufklärungen über das Wesen der Salvarsanwirkung zu erwarten waren.

Es war zunächst *Völckers'* Beobachtung, daß *gleichzeitige Staphylokokkeninfektion und Salvarsaninfektion* innerhalb kürzester Frist zum Tode führt, die weiterer Prüfung bedurfte. Besonders auffallend war diese Erscheinung in einem Versuch, der bei acht Tieren mit einem wenig virulenten Staphylokokkenstamm vorgenommen wurde. Hier ging ein mit Salvarsan sofort nach der Infektion behandeltes Tier innerhalb von 45 Stunden akut zugrunde, während die übrigen nach 16 bzw. 24 Stunden behandelten oder teilweise auch ganz unbehandelten Tiere frühestens nach 10 Tagen starben, zum Teil aber überlebten. Im Sektionsbefund bei dem akut verendeten Tier waren auffallend das Auftreten von Hämorrhagien in Rectum und Kolon, eines Exsudats in der Bauchhöhle und zahlreiche Abscesse in den Nieren.

Die weitere Verfolgung dieser Beobachtung erschien deshalb von Interesse, weil die Toxizitätssteigerung des Salvarsans durch Bakterien bereits vielfach diskutiert worden ist, ohne daß diese Frage bisher befriedigende Erklärung gefunden hätte. Man wurde auf diesen Vorgang zuerst aufmerksam durch die dem sog. Wasserfehler zur Last gelegten toxischen Erscheinungen nach Salvarsaninjektionen, die *Ehrlich* auf das Zusammentreffen mit dem im ungenügend sterilisierten Wasser vorhandenen Bakterienleibern zurückführte. Experimentelle Untersuchungen, die nach dieser Richtung von *Jakimoff* und *Kohl-Jakimoff*[4]) vorgenommen wurden, ergaben, daß das Salvarsan bei Anwesenheit von Bakterienendotoxinen allem Anschein nach eine Steigerung seiner Toxizität erfuhr, die das Mehrfache der ursprünglich toxischen Dosis betrug, besonders, wenn die Tiere gleichzeitig noch mit



Trypanosomen infiziert waren. Auch in anderen experimentellen Feststellungen (*Reiter*, *Mystroem*) und in der Praxis (*Gutmann*, *Almkvist*, *Ruhemann*, *Gennerich*) ergeben sich Befunde über Vergiftungserscheinungen, die mit dem Zusammentreffen von Salvarsanbehandlung und bakteriellen Sekundärinfektionen erklärt wurden. Ob hier tatsächlich eine Toxizitätssteigerung des Salvarsans vorliegt, oder ob die Erscheinungen — ähnlich wie bei dem „Konträreffekt" — darauf zurückzuführen sind, daß aus irgendwelchen Ursachen infolge der Einwirkung des Chemotherapeuticums eine stärkere Vermehrung der Parasiten und damit eine Verschlimmerung des Krankheitsbildes eintritt, ist aber nicht entschieden.

## *Versuche.*

### *Krankheitsbeschleunigende Wirkung des Salvarsans auf die Staphylokokkeninfektion des Kaninchens bei gleichzeitiger Infektion und Behandlung.*

Es wurden zunächst eine Anzahl von Versuchen mit gleichzeitiger Infektion und Salvarsaninjektion vorgenommen, um entscheiden zu können, ob die von *Völckers* dabei beobachtete akute Verschlimmerung des Krankheitsprozesses tatsächlich die Regel bildet.

### *Versuchsprotokolle.*

*Tabelle I.*

Infektionsdosis: 0,25 ccm, 24 stündige Bouillonkultur (Staphylokokken) Stamm 1 intravenös.

Behandlung: Sofort nach der Infektion einmalig mit Altsalvarsan intravenös (0,02 g p. kg).

| Datum | Kaninchen Nr. | Gewicht g | Infektion und Behandlung | | Tod nach | Sektionsbefund | Bakteriologischer Staphylokokkenbefund in Blut und Organen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Staphylokokken | Altsalvarsan | | | |
| 1921 | | | | | | | |
| 14. XI. | 1 | 1125 | Reine Bouillon 0,25 ccm | 0,02 g p. kg | Lebt | · | — |
| 14. XI. | 3 | 1675 | Staphylokokkenbouillon 0,25 ccm | 0,02 „ „ „ | 9 Tg. | Milz normal, Nierenmetastasen, Lebermetastas. | + |
| 14. XI. | 4 | 1470 | 0 | 0,02 „ „ „ | Lebt | · | — |
| 14. XI. | 2 | 1600 | Staphylokokkenbouillon 0,25 ccm | 0 | 10 Tg. | Leberinfarkte, Lungeninfarkte, Nierenmetastas. Inguinaldrüsemetastasen | + |
| 14. XI. | 5 | 1400 | Desgl. | 0 | 12 „ | Pneumonie, Pericarditis fibrinosa, Nierenmetastas. | + |

*Ergebnis:* Versuch mit wenig virulentem Stamm. Mit Altsalvarsan 0,02 g p. kg behandeltes Tier (3) stirbt nach 9 Tagen, die unbehandelten Kontrollen (2 und 5) nach 10 und 12 Tagen.



*Tabelle II.*

Infektionsdosis: 1,0 ccm, 24stündige Staphylokokkenbouillon Stamm 3 intravenös.
Behandlung: Sofort nach der Infektion einmalig mit Altsalvarsan intravenös (0,02 g p. kg).

| Datum | Kaninchen Nr. | Gewicht g | Infektion und Behandlung: Staphylokokken | Infektion und Behandlung: Altsalvarsan | Tod nach | Sektionsbefund | Bakteriologischer Staphylokokkenbefund in Blut und Organen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1921 5. XII. | 8 | 1850 | Staphylokokkenbouillon 1,0 ccm | 0,02 g p. kg | 40 Std. | Milz klein, Herzmuskelmetast. Leber-u.Nierenmetastase | + |
| 5. XII. | 9 | 1510 | Staphylokokkenbouillon 1,0 ccm | 0 | 120 „ | Milz vergrößert, Lungeninfarkt, Leber-u.Nierenmetastase | + |
| 5. XII. | 10 | 2010 | Staphylokokkenbouillon 1,0 ccm | 0,02 g p. kg | 60 „ | Herzmuskelmetastase, Nierenmetastase | + |
| 5. XII. | 11 | 1900 | · | 0,02 g p. kg | lebt | · | — |
| 5. XII. | 12 | 1850 | Reine Bouillon 1,0 ccm | 0,02 „ „ „ | „ | · | — |

*Ergebnis:* Wenig virulenter Stamm. Unbehandelte Kontrolle (9) stirbt nach 120 Stunden, mit Altsalvarsan 0,02 g p. kg behandelte Tiere (8 und 10) sterben nach 40 und 60 Stunden.

*Tabelle III.*

Versuch mit Altsalvarsan und Staphylokokkenbouillon- (Stamm 3) Gemisch.
Intravenöse Injektion sofort nach dem Mischen und nach $^1/_2$ und 1 Stunde Stehenlassen bei 37°.

| Datum | Kaninchen Nr. | Gewicht g | Infektion und Behandlung | Tod nach | Sektionsbefund | Bakteriologischer Staphylokokkenbefund in Blut und Organen |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1921 13. XII. | 13 | 1500 | Sofort nach d. Mischen von Staphylokokkenbouillon 1,0 ccm und Altsalvarsan 0,02 g p. kg | 24 Std. | Lungenentzünd. Hyperämie in Nieren u. Leber | + |
| 13. XII. | 14 | 1000 | Dasselbe nach $^1/_2$stündigem Stehen der Mischung bei 37° | 68 „ | Herzmuskelabscesse. Nieren- und Lebermetastasen | + |
| 13. XII. | 15 | 2100 | Dasselbe nach 1stündigem Stehen der Mischung bei 37° | 92 „ | Herzmuskelabscesse. Nieren- und Lebermetastasen. Milz vergrößert | + |
| 13. XII. | 16 | 2800 | Kontrolle: Sterile Bouillon 1 ccm und Altsalvarsan 0,02 g p. kg 1 Std. Stehen der Mischung bei 37° | lebt | · | · |
| 13. XII. | 17 | 2300 | Staphylokokkenbouillon 1,0 ccm | 70 „ | Exsudat und Verwachsungsstränge in der Brusthöhle. Nierenmetastas. Milz vergrößert | + |

*Tabelle III* (Fortsetzung).

| Datum | Kaninchen Nr. | Gewicht g | Infektion und Behandlung | Tod nach | Sektionsbefund | Bakteriologischer Staphylokokkenbefund in Blut und Organen |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1921 13. XII. | 18 | 2700 | Staphylokokkenbouillon 1,0 ccm gleich darauf Altsalvarsan 0,02 g p. kg | 96 Std. | Pericarditis fibrosa. Milz vergröß. Nierenmetastas. Bauchwandabscesse | + |

*Ergebnis:* Bei Digerieren von Altsalvarsan und Staphylokokkenbouillon kein toxisches Produkt, eher leichte Abschwächung der krankmachenden Wirkung.

*Tabelle IV.*

Infektionsdosis: 1,0 ccm 24 stündige Staphylokokkenbouillon (Stamm 3) intravenös.
Behandlung: Sofort nach der Infektion einmalig mit Neosalvarsan oder Silbersalvarsan intravenös.

| Datum | Kaninchen Nr. | Gewicht g | Infektion und Behandlung | | Tod nach | Sektionsbefund | Bakteriologischer Staphylokokkenbefund in Blut und Organen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Staphylokokken | Salvarsan | | | |
| 1921 20. XII. | 19 | 2400 | Staphylokokkenbouillon | Neosalvarsan 0,04 g p. kg | 120 Std. | Pericarditis fibrosa, groß. Absceß am Herzen, Nierenmetastasen | Nicht untersucht |
| 20. XII. | 20 | 2000 | Desgl. | Desgl. | 65 „ | Abscesse a. Herzmuskel, Nierenmetastasen, Milz klein | + |
| 20. XII. | 21 | 2700 | Desgl. | Silbersalvars. 0,008 g p. kg | 60 „ | Pericarditis fibrosa, Herzmuskelabscesse, Nieren- und Lebermetastasen, Milz vergrößert | + |
| 20. XII. | 22 | 3000 | Desgl. | Desgl. | 30 „ | Leber- u. Nierenmetastas., Herzmuskelmetastasen, Lungenentzündung | + |
| 20. XII. | 23 | 2000 | Desgl. | θ | 144 „ | Herzmuskelmetastasen. Nieren- und Lebermetastasen | Nicht untersucht |
| 20. XII. | 24 | 2400 | Desgl. | θ | 120 „ | Herzmuskelabscesse, Pericarditis fibrosa | + |

*Ergebnis:* Wenig virulenter Stamm. Unbehandelte Kontrollen (23 und 34) sterben nach 144 und 120 Stunden. Ein mit Neosalvarsan 0,04 g p. kg behandeltes Tier (19) stirbt nach 120 Stunden, ein zweites (20) nach 65 Stunden. Zwei mit Silbersalvarsan behandelte Tiere (21 und 22) starben nach 60 und 30 Stunden.



*Tabelle V.*

Infektionsdosis: 1,0 ccm 24 stündige Staphylokokkenbouillon (Stamm 3) intravenös.

Behandlung: Sofort nach der Infektion einmalig mit Neosalvarsan intravenös.

| Datum | Kaninchen Nr. | Gewicht g | Infektion und Behandlung | | Tod nach | Sektionsbefund | Bakteriologischer Staphylokokkenbefund in Blut und Organen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Staphylokokken | Neosalvarsan | | | |
| 23. I. 1922 | 25 | 2100 | Staphylokokkenbouillon 1 ccm | 0,04 g p. kg | 33 Std. | L. Herzkammer enthält nichtkoaguliert. Blut. Nieren hyperämische Blutungen im Darm. Milz normal | + |
| 23. I. 1922 | 26 | 1900 | Desgl. | 0,08 " " " | 68 " | Herzmuskelabscesse. Nierenmetastasen, Pericarditis fibrosa. Milz vergrößert | + |
| 23. I. 1922 | 27 | 1900 | Desgl. | 0,15 " " " | 57 " | Leber- u. Nierenmetastas., Herzmuskelabscesse, Milz vergrößert | + |
| 23. I. 1922 | 28 | 1500 | Desgl. | 0,3 " " " | 3 " | L. Herzkammer enthält unkoaguliertes Blut v. mäßiger Menge. Darmblutungen | + |
| 23. I. 1922 | 29 | 2100 | · | 0,3 " " " allein | 12 Tg. | Stark abgemag., sonst normal | Befund d. Blutausstrichpräparates: Viele Eosinophyle, keine Blutplättchen |
| 23. I. 1922 | 30 | 1900 | Abgetötete Staphylokokkenbouillon 1 ccm (½ Std. 56°) | St. Neosalv. 0,15 g p. kg | lebt | · | · |
| 23. I. 1922 | 31 | 1900 | Desgl. | 0,3 " " " | lebt | · | · |
| 23. I. 1922 | 32 | 1200 | Staphylokokkenbouillon 1 ccm | · | 57 Std. | Herzmuskelmetastasen, Leber- u. Nierenmetastasen, Pericarditis fibrosa | + |

***Ergebnis:*** Virulenter Stamm. Unbehandeltes Tier (32) von geringem Gewicht stirbt nach 57 Std. Mit steigenden Konzentrationen Neosalvarsan (0,04, 0,08, 0,15, 0,3 g) behandelte Tiere (25, 26, 27, 28) sterben nach 33, 68, 57 und 3 Stunden. Mit durch Hitze abgetöteten Staphylokokken bei gleichzeitiger Salvarsanbehandlung keine Erscheinungen (Kontrollen 30 und 31).



*Tabelle VI.*

**Infektionsdosis: 1,0 ccm Staphylokokkenbouillon (Stamm 3) intravenös.**
**Behandlung: Sofort nach der Infektion einmalig mit Neosalvarsan intravenös.**

| Datum | Kaninchen Nr. | Gewicht g | Infektion und Behandlung | | Tod nach | Sektionsbefund | Bakteriologischer Staphylokokkenbefund in Blut und Organen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Staphylokokken | Neosalvarsan | | | |
| 1922 | | | | | | | |
| 20. II. | 33 | 1030 | Staphylokokkenbouillon 1 ccm | 0,04 g p. kg | 29 Std. | Niere hyperäm. Milz normal. Keine Darmblutungen | + |
| 20. II. | 34 | 1190 | Desgl. | 0,4 „ „ „ | 3 „ | Darmblutungen. Nieren hyperämisch. L. Herzkammer enthält unkoagul. Blut | + |
| 20. II. | 35 | 1060 | Desgl. | 0,15 „ „ „ | 24 „ | Lungeninfarkt. Nieren hyperämisch. Lebermetastasen. Milz normal. | + |
| 20. II. | 36 | 1030 | Desgl. | 0,3 „ „ „ | 25 „ | Herzmuskelabscesse. Nieren- u. Lebermetast. Milz normal | + |
| 20. II. | 37 | 1000 | · | 0,3 „ „ „ | 72 „ | Stark abgemagert Nieren anämisch | — |
| 20. II. | 38 | 1050 | Abgetöt. Staphylokokkenbouill. 2 ccm | 0,15 „ „ „ | 7 Tg. | Stark abgemagert Sonst o. B. | — |
| 20. II. | 39 | 1000 | Desgl. | 0,3 „ „ „ | 12 „ | Stark abgemagert Nieren anämisch | — |
| 20. II. | 40 | 1000 | Staphylokokkenbouillon 1 ccm | · | 30 Std. | Milz norm. Nieren hyperäm. Keine Metastase. | + |
| 20. II. | 41 | 900 | Desgl. | · | 48 „ | Herzmuskelabscesse. Nieren hyperämisch | + |
| 20. II. | 42 | 1750 | Desgl. | · | 30 „ | Lebermetastasen. Herzmuskelabscesse. Pericarditis fibrosa | + |

***Ergebnis:*** **Virulenter Stamm. Unbehandelte Kontrollen (40, 41, 42) sterben nach 30, 48, 30 Stunden. Mit steigenden Neosalvarsankonzentrationen (0,04, 0,15, 0,3, 0,4 g p. kg) behandelte Tiere (33, 35, 36, 34) sterben nach 29, 24, 25 und 3 Std. Bei Injektion von abgetöteten Staphylokokken und Neosalvarsan (38, 39) keine akuten Erscheinungen (Kaninchen 38, 39).**



Mit anderen Worten sterben in der Mehrzahl der Fälle in diesen Versuchen die mit Staphylokokken intravenös infizierten Kaninchen, welche sofort nach der Infektion mit Salvarsan behandelt werden, rascher als die ebenso infizierten aber unbehandelten Kontrollen. Das Ergebnis ist in der Regel so eindeutig, daß es näherer Hinweise auf Einzelheiten nicht bedarf. Dabei ist zu berücksichtigen, daß nach den in den späteren Versuchen vorgefundenen komplizierten Verhältnissen ein derartig regelmäßiger Versuchsausfall nicht einmal erwartet werden darf. Ausnahmen von diesem Verhalten finden sich in Tabelle III, wo Kaninchen 18, mit Staphylokokken infiziert und gleich darauf mit Salvarsan behandelt, die unbehandelte Kontrolle (17) um 26 Stunden überlebt, während ein zweites in ähnlicher Weise gleich nach der Mischung von Staphylokokkenbouillon und Salvarsan im gleichen Mengenverhältnis behandeltes Tier (13) akut nach 24 Stunden, 46 Stunden vor der unbehandelten Kontrolle eingeht. Ausnahmen finden sich ferner in Versuch 4, wo Kaninchen 19, mit Neosalvarsan gleich nach der Infektion behandelt, ebenso lange lebt wie eine der beiden Kontrollen; endlich in Versuch 5, wo das besonders magere Kontrolltier (32) ein abweichendes Verhalten zeigt. Im übrigen aber *wird durch das gleich im Anschluß an die Infektion verabreichte Salvarsan der Krankheitsverlauf zumeist deutlich, zum Teil ganz auffallend beschleunigt.*

Für die Deutung des Zustandekommens der Verschlimmerung des Krankheitsverlaufs durch die Salvarsanbehandlung gleich nach der intravenösen Staphylokokkeninfektion des Kaninchens ist es bemerkenswert, daß gleich nach der Injektion *von durch Hitze abgetöteten Staphylokokken in den für die Injektion verwendeten Mengen und nachfolgender Salvarsanbehandlung selbst mit hohen toxischen Dosen Salvarsan* (*Tabelle V und VI*) *akute Erscheinungen nicht beobachtet werden.* Allem Anschein nach handelt es sich dabei also nicht lediglich um eine Steigerung der Toxizität des Salvarsans durch freigewordene Endotoxine der einverleibten Bakterien, sondern es ist das Zustandekommen der akuten Symptome an die Anwesenheit der *lebenden* Erreger gebunden. Aber auch bei der *direkten Einwirkung von Staphylokokken* (Tabelle III) *auf das Salvarsan in vitro* und bei 37° *entsteht nicht etwa ein toxisches Produkt*, das die Krankheitserscheinungen auslösen könnte, sondern es wird durch eine derartige Behandlung im Gegenteil eher eine Abschwächung der krankmachenden Wirkung herbeigeführt. Und endlich ist eine Toxizitätssteigerung des Salvarsans, wie sie auch indirekt etwa infolge der Schädigung des Tierkörpers durch die Infektion erfolgen könnte, auch deshalb nicht wahrscheinlich, weil ein solches stärkeres Hervortreten der Giftwirkung des Salvarsans sich weit ausgeprägter und regelmäßiger, als es bei unseren Versuchen (Tab. V, VI und spätere Versuche Tab. IX) der Fall war, bei der Anwendung hoher Dosen zeigen müßte.

Diese Erwägungen, auf die wir später noch zurückkommen, legten es nahe, anzunehmen, daß das Salvarsan bei unserer Versuchsanordnung eine *gewisse Schädigung des Tierkörpers* bewirkt, die nun das Vordringen der Erreger erleichtert und so *tatsächlich den Krankheitsverlauf beschleunigt*. Wir haben daher versucht, im Experiment auch Anhaltspunkte für die Vermutung zu gewinnen, daß die Nachteile einer Organotropie*) des Salvarsans bei der künstlichen Infektion des Kaninchens mit Staphylokokken nicht ausgeglichen werden durch die Vorteile, die eine etwaige bakteriotrope Wirkung des Mittels gegenüber den Staphylokokken zu bieten vermag.

### *Organotrope Wirkungen*) des Salvarsans.*

Versetzt man im Reagensglase Salvarsan in bestimmten Konzentrationen mit Serum, so bildet sich nach kürzester Zeit, am deutlichsten sichtbar bei dem *Mischen von 0,01 g Salvarsan mit 1 ccm Serum ein flockiger Niederschlag*. Untersuchungen über die Bedeutung dieses Salvarsanpräcipitats sind im Gange. Wir haben hier den *sichtbaren* Ausdruck für die Affinität des Salvarsans zu Bestandteilen des Serums, die zur Bildung eines chemischen Reaktionsproduktes führt.

Vermuteten wir schädigende Wirkungen des Salvarsans bei seiner Anwendung bei der experimentellen Staphylokokkeninfektion, so konnten sich derartige Schädigungen vor allem bei den Abwehrvorgängen des Tierkörpers zeigen. Ließ sich hier nach Einverleibung von Salvarsan wirklich ein Versagen der Abwehrreaktionen nachweisen, so war eine krankheitsbeschleunigende Wirkung durch das so ermöglichte leichtere Vordringen der Staphylokokken um so leichter erklärlich. Wir haben daher das *Verhalten des Komplements nach Salvarsaninjektionen* einer genauen Prüfung unterzogen.

Zwar sind in der Literatur bereits Untersuchungen über die Wirkung des Salvarsans auf die Hämolyse bekannt, die namentlich wegen ihrer Beziehungen zum Ausfall der Wassermannschen Reaktion interessieren mußte [*W. Schwartz* und *P. Flemming*[5])]. Es handelt sich dabei um Reagensglasversuche, in denen die hämolysehemmende Wirkung hoher Salvarsandosen festgestellt, aber keine weiteren Ermittlungen über die Angriffspunkte des Salvarsans bei dieser Erscheinung angestellt wurden.

Versetzt man in den oben geschilderten Versuchen das komplementhaltige Serum, in dem man mittels bestimmter Salvarsankonzentrationen ein Präcipitat erzeugt hat, mit Hammelblutkörperchen, die mit entsprechendem Amboceptor beladen sind, so tritt keine Hämolyse ein.

Bei quantitativer Auswertung dieses Versuchs mit fallenden Dosen Salvarsan und gleichen Mengen frischen Serums und sensibilisierten Hammelblutkörperchen ergibt sich folgendes:

---

*) Affinität zu cellulären sowie humoralen Bestandteilen des Organismus.



*Tabelle VII.*

**Hämolyse von 0,5 ccm 5 proz. Hammelblutkörperchenaufschwemmung mit 3 fach lösendem Amboceptor, bei Gegenwart von 0,2 ccm *Kaninchen*serum und steigenden Verdünnungen *Neosalvarsan* bei einem Gesamtvolumen von 3,0 ccm Flüssigkeit.**

| Röhrchen | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Neosalvarsan | 0,001 | 0,00075 | 0,0005 | 0,00025 | 0,0001 | 0 |
| Hämolyse | 0 | m | k | k | k | k |
| nach | 24 Std. | 24 Std. | 30 Min. | 30 Min. | 30 Min. | 30 Min. |

*Tabelle VIII.*

Dasselbe mit *Meerschweinchenserum* 0,1.

| Röhrchen | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Hämolyse | 0 | 0 | 0 | k | k | k |
| nach | 60 | 60 | 60 | 15 | 15 | 15 Min. |

Über die so nachweisbare hemmende Wirkung des Neosalvarsans auf die Komplementhämolyse in vitro haben wir auch in anderen Versuchen quantitativ entsprechende Ergebnisse erzielen können. Im Durchschnitt wird die ***Komplementwirkung von 1,0 ccm Vollserum*** (sowohl Kaninchen- wie Meerschweinchenserum) auf ***0,5 ccm 5 proz. Hammelblutkörperchenaufschwemmung vollständig gehemmt durch 0,005 g Neosalvarsan.***

Aber nicht nur beim Mischen von Salvarsan mit Serum im Reagensglase, sondern auch nach der Injektion in den Tierkörper läßt sich eine Beeinflussung der Komplementfunktion im Serum nachweisen.

Wir haben unter verschiedenen Bedingungen die ***komplettierenden Eigenschaften von Kaninchen und Meerschweinchensera nach der intravenösen Applikation des Neosalvarsans*** untersucht und folgende Verhältnisse vorgefunden.

***Tabelle IX. Komplementgehalt im Serum bei Kaninchen nach Salvarsanbehandlung.***

| Datum | Kaninchen Nr. | Gewicht g | Infektion und Behandlung: Staphylokokken | Infektion und Behandlung: Neosalvarsan intravenös | Komplementtiter v. Behandl. | Komplementtiter nach der Behandlung: 1 Stunden | 5 | 6 | 18 | 48 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1922 27. II. | b 1 | 1900 | Staphylokokken-bouillon 1 ccm | 0,3 g p. kg | 0,15 | 0 | 0 | · | 0,2 | · |
| 3. III. | b 2 | 1995 | Desgl. | 0,3 „ „ „ | 0,15 | 0 | · | · | · | · |
| 3. III. | b 3 | 1800 | Desgl. | 0 | 0,15 | 0,15 | 0,2 | · | 0,2 | 0,1 |
| 3. III. | b 4 | 2000 | 0 | 0,3 g p. kg | 0,15 | · | 0,15 | · | 0,2 | · |
| 7. III. | b 5 | 1950 | 1 ccm | 0,04 „ „ „ | 0,1 | 0,15 | · | 0,15 | 0,15 | · |
| 7. III. | b 6 | 1600 | 1 „ | 0 | 0,1 | 0,1 | · | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 7. III. | b 7 | 1900 | 0 | 0,04 g p. kg | 0,1 | 0,15 | · | 0,15 | 0,15 | 0,1 |
| 20. III. | b 8 | 2050 | 0 | 0,3 „ „ „ | 0,15 | 0 | 0,2 | · | · | 0,2 |
| 25. IV. | b 13 | 2380 | 0 | 0,3 „ „ „ | 0,2 | 0 | 0 | · | 0 | 0,2 |
| 28. IV. | b 14 | 2100 | 1 „ | 0,3 „ „ „ | 0,15 | · | 0 | · | · | · |
| 28. IV. | b 15 | 2000 | 1 „ | 0 | 0,15 | · | 0,15 | · | · | · |
| 2. V. | b 16 | 1400 | 0,3 ccm | 0,02 g p. kg | 0,2 | · | 0,2 | · | · | · |
| 2. V. | b 17 | 1400 | 0,3 „ | 0 | 0,2 | · | 0,2 | · | · | · |
| 4. V. | b 18 | 2570 | 0,3 „ | 0,02 g p. kg | 0,1 | · | 0,15 | · | 0,15 | · |
| 4. V. | b 19 | 2450 | 0 | 0,02 „ „ „ | 0,1 | · | 0,15 | · | 0,15 | · |
| 9. V. | b 20 | 1680 | 0,3 ccm | 0,02 „ „ „ | 0,1 | · | 0,2 | · | · | · |
| 9. V. | b 21 | 1850 | 0 | 0,02 „ „ „ | 0,1 | 0.15 | · | · | · | · |



Die Komplementtitration erfolgte, indem fallende Mengen des Serums (0,2 bis 0,02) mit gleichen Mengen (0,5 ccm) 5 proz. Hammelblutkörperchensuspension und 2—3 fach lösender Amboceptordosis versetzt wurden (Gesamtvolumen 2,5 ccm). Alle am gleichen Tag entnommenen Proben (Serum vor der Behandlung 1,5 und 6 Stunden nach der Behandlung) wurden jeweils unter genau übereinstimmenden Versuchsbedingungen und mit denselben Reagenzien angesetzt, so daß hier die Berücksichtigung kleinster Ausschläge zulässig ist, zumal jeder Reagensglasversuch in doppelter Ausführung angestellt wurde. Bei den in eintägigen Abständen erfolgten Blutentnahmen (18, 24, 48 Std.) ist trotz Verwendung gleicher Reagenzien und den üblichen Kontrollen die Beurteilung kleiner Schwankungen des Komplementtiters nur unter gewissem Vorbehalt möglich. Die Ablesung erfolgt zeitlich bis zum vollständigen Ablauf der Reaktionen. Unter Komplementtiter ist diejenige Komplementdosis zu verstehen, mit der noch komplette Hämolyse erzielt wird.

Die Ergebnisse der mit und ohne Infektion und Neosalvarsanbehandlung bei Kaninchen erzielten Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen.

*Bei hohen Salvarsandosen* (*0,3 g. p. kg*) wird, sei es bei infizierten oder nichtinfizierten Kaninchen, gleich nach der intravenösen Injektion des Mittels im Serum ein *Verlust der hämolytischen Komplementwirkung* innerhalb der geprüften Serumkonzentration beobachtet.

Das Versagen der Komplementwirkung ist nach 1, 5 und 18 Stunden noch zu konstatieren. In einem Fall (Kan. 4) ist die Komplementwirkung bereits nach 5 Stunden wiederhergestellt, in anderen Fällen erst nach 24 oder 48 Stunden. Dem Komplementschwund parallel geht in allen Fällen eine *ausgeprägte Verzögerung der Blutgerinnung*, deren Eintritt in einigen Fällen bei Meerschweinchen wie Kaninchen selbst nach mehreren Stunden nicht beobachtet werden konnte.

Auch beim Meerschweinchen konnten wir ähnliche Feststellungen machen, wie dies aus den in Tabelle X angegebenen Versuchen ersichtlich ist.

*Tabelle X.*
*Komplementgehalt im Serum bei Meerschweinchen nach Salvarsanbehandlung.*

| Datum | Meerschweinchen Nr. | Gewicht g | Neosalvarsan p. kg | Komplementgehalt vor Behandlung | Komplementgehalt nach Behandlung | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | sofort | 15 Min. | 1 Std. |
| 8. III. 1922. | 1 | 610 | 0,3 g | 0,01 | 0 | · | · |
| 8. III. 1922. | 2 | 600 | 0,3 g | 0,01 | · | 0 | · |
| 10. III. 1922. | 3 | 460 | 0,15 g | 0,025 | · | · | 0 |
| 21. III. 1922. | 5 | 590 | 0,3 g | 0,025 | · | · | 0 |

Ob es sich bei diesen Vorgängen um eine *Komplementzerstörung* durch das Salvarsan handelt, die auch nach der Ausscheidung des Salvarsans aus dem Blut bestehen bleibt und nur durch Neubildung von Komplement ausgeglichen wird, oder ob eine *antikomplementäre Wirkung* des Salvarsans vorliegt, die mit dessen Verschwinden aufgehoben wird, war für unsere Fragestellung zunächst nicht von Belang. Wir hatten in Reagensglasversuchen festgestellt, daß durch 0,005 g Neosalvarsan die hämolytische Komplementwirkung von 1 ccm Meerschweinchen-

oder Kaninchenserum noch gerade vollständig gehemmt wird. Gleich nach der Injektion von 0,3 g p. kg werden nun derartige Konzentrationen im Serum, wenn dem Kilo Tiergewicht ca. 66 ccm Serum (= $^1/_{15}$ Körpergewicht) entspricht, sicherlich erreicht werden können und das Schwinden der Komplementwirkung wird sich zwanglos aus der Anwesenheit an sich hemmender Salvarsanmengen erklären lassen. Anders liegen die Verhältnisse aber beispielsweise bei Kaninchen b 13, bei dem noch nach 18 Stunden ein vollständiger Schwund der Komplementwirkung besteht, während gleichzeitig ein Teil des Salvarsans bereits ausgeschieden sein mußte. Bei Anwendung der *Abelin*schen[6]) Farbreaktion zum Nachweis des Salvarsans im *Authenrieth*schen Colorimeter*) fanden sich in diesem Fall folgende Neosalvarsanmengen im Kubikzentimeter Serum: 1 Std. nach der Injektion 0,0106, 5 Std. 0,000 288, 18 Std. 0,00016, 48 Std. 0. Wir haben also nach 5 und 18 Stunden trotz für direkte Hemmung unzureichenden Salvarsangehalts des Serums vollständige Hemmung der Hämolyse. Außerdem übte in anderen Versuchen der Zusatz von Serumproben, die 5 Stunden nach der Neosalvarsanbehandlung entnommen wurden und selbst keine Komplementwirkung mehr zeigten, weder im aktiven noch im inaktiven Zustand in quantitativen Reihen hemmende Wirkung auf die komplettierende Fähigkeit normalen Serums aus. Wir glauben daher schon jetzt eine *Inaktivierung des Komplements durch das Salvarsan* annehmen zu können. Weitere Versuche über diese Frage, die noch nach verschiedener Richtung der Klärung bedarf, sind im Gange.

Nach Applikation *therapeutischer Dosen des Neo*salvarsans (0,02 bis 0,04 g p. kg) läßt sich in fünf Fällen (Kan. b 5, b 7, b 18, b 19, b 20) ein *wenn auch nur geringer, so doch nicht zu leugnender Rückgang des Komplementtiters feststellen.* Dieser Rückgang macht sich in gleicher Weise bei infizierten wie nichtinfizierten Tieren bemerkbar. Nur in einem Fall (b 16) verhält sich das Tier vor der Behandlung ebenso wie nach der Behandlung.

Von vier *nur mit Staphylokokken infizierten, nicht mit Salvarsan behandelten Tieren* (b 3, b 6, b 15, b 17), *treten bei drei Tieren keine, bei einem geringfügige Schwankungen des Komplementgehaltes in Erscheinung.*

Bei *normalen* Tieren haben wir im Verlauf eines Tages keine Schwankungen nachweisen können.

Die *Affinität des Neosalvarsans zu Bestandteilen des Tierkörpers führt mit anderen Worten bei hohen, therapeutisch nicht zur Anwendung gelangenden Dosen also auch zu einer ausgesprochenen Hemmung der Komplementfunktion, die sich auch nach der Applikation therapeutischer Dosen noch angedeutet zeigt.*

*Die entwicklungshemmende Wirkung des Salvarsans auf Staphylokokken.*

Über die Wirkung des Salvarsans auf Staphylokokken in vitro finden sich in der Literatur nur die Angaben von *Häussler*[7]) und *Lucksch*[8]), die im Reagensglas übereinstimmend eine außerordentlich große Resistenz dieser Erreger gegenüber dem Salvarsan feststellen.

*) Die Methode, welche innerhalb gewisser Grenzen brauchbare Resultate liefert, wird demnächst von Herrn Dr. *Remy* veröffentlicht.

Wir haben zur Orientierung über die Entwicklungshemmung daher zunächst einige Reagensglasversuche angestellt.

Um einen Vergleich mit den später zu erwähnenden Versuchen mit Serum von salvarsanbehandelten Tieren zu ermöglichen, wurden die *Versuchsbedingungen* folgendermaßen gewählt. In den Röhrchen wird je 1 ccm Bouillon mit der gleichen Menge in Bouillon hergestellter Salvarsankonzentrationen versetzt. In diese Salvarsanbouillongemische wird je 0,2 ccm einer Kochsalzlösung eingetragen, die im Kubikzentimeter $^1/_{100000}$ Öse einer 18stündigen Staphylokokkenschrägagarkultur enthält. Nach bestimmten Zeiten erfolgt aus den Gemischen die Entnahme und Aussaat von je 0,1 ccm zu Gelatineplatten.

*Tabelle XI.*

| Röhrchen | Konzentration des Neosalvarsans | Wachstum in Bouillon-Neosalvarsan-gemischen nach 5 Tagen | Kolonienzahl auf Gelatineplatten bei Aussaat nach | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | sofort | 8 Std. | 6 Std. | 24 Std. |
| 1 | 0,01 | — | 18 | 6 | 0 | 0 |
| 2 | 0,01 | — | 22 | 3 | 0 | 0 |
| 3 | 0,001 | — | 36 | 36 | 48 | 0 |
| 4 | 0,001 | — | 25 | 56 | 160 | 0 |
| 5 | 0,0001 | — | 576 | 204 | 148 | 32 |
| 6 | 0,0001 | — | 368 | 260 | 210 | 27 |
| 7 | 0,00001 | +++ | 400 | 180 | 188 | ∞ |
| 8 | 0,00001 | +++ | 444 | 200 | 242 | ∞ |
| 9 | 0 | +++ | 504 | 610 | 696 | ∞ |

*Tabelle XII.*

| Röhrchen | Neosalvarsan | Wachstum in Bouillon-Neosalvarsangemischen nach 5 Tagen | Kolonienzahl bei Aussaat nach 24 Stunden |
|---|---|---|---|
| 1 | 0,0001 | — | 0 |
| 2 | 0,00005 | — | 0 |
| 3 | 0,000025 | — | 0 |
| 4 | 0,0000125 | — | 0 |
| 5 | 0,00001 | +++ | ∞ |
| 6 | 0 | +++ | ∞ |

Wir können als das wichtigste Kennzeichen der Salvarsanwirkung auf Staphylokokken, wie das *Schiemann* für andere Bakterienarten bereits betont hat, eine entwicklungshemmende Wirkung feststellen, die durch *die Langsamkeit ihres Auftretens* charakterisiert ist. Nach 24stündiger Einwirkung wirken Verdünnungen von 1:80 000*) im Bouillonmedium noch deutlich entwicklungshemmend auf Staphylokokken. Auch in stärkeren Konzentrationen von 1:1000 erreicht die Entwicklungshemmung erst nach 24 Stunden ihre volle Stärke.

Was nun die *entwicklungshemmende Wirkung des Serums von Kanin-*

*) Es handelt sich um denselben Staphylokokkenstamm, der für einen Teil der geschilderten Infektionsversuche angewendet, und der auch zur Prüfung von Desinfektionsmethoden verschiedener Art herangezogen wurde, wobei er sich beispielsweise auch gegenüber dem Sublimat durch besondere Widerstandsfähigkeit auszeichnete.

*chen nach der Behandlung mit Neosalvarsan* betrifft, so unterrichten darüber eine Anzahl von Versuchen, die wir nach Anwendung hoher sowie therapeutischer Dosen Neosalvarsan bei mit Staphylokokken infizierten und nichtinfizierten Kaninchen anstellten. Da die Versuchsergebnisse bei Anwendung gleicher Salvarsandosen durchaus identisch sind, gleichgültig, ob Infektion vorlag oder nicht, so beschränken wir uns darauf, zwei von insgesamt zehn Versuchen in allen Einzelheiten anzuführen. (Tab. XIII).

*Tabelle XIII.*

| Kaninchen Nr. Behandlung | Röhrchen Nr. | Entnahme des Serums | Art des Serums oder Kontrolle | Kolonienzahl bei Aussaat | | | | Komplementtiter | Salvarsankonzentration im Serum colorimetrisch |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | sofort | nach 3 Std. | nach 6 Std. | nach 24 Std. | | |
| B 13 0,3 g Neosalvarsan p.kg | 1 | Vorher | Aktiv | 920 | 280 | · | ∞ | 0,2 | 0 |
| | 2 | | " | 928 | 192 | · | ∞ | | |
| | 3 | | Inaktiv | 762 | 696 | · | ∞ | | |
| | 4 | | " | 890 | 936 | · | ∞ | | |
| | 5 | 5 Stunden nach d. Behandlung | Aktiv | 200 | 180 | · | 0 | 0 | 0,000 285 |
| | 6 | | " | 244 | 950 | · | 0 | | |
| | 7 | | Inaktiv | 950 | 2400 | · | 520 | | |
| | 8 | | " | 1250 | 2800 | · | 220 | | |
| | 9 | | Bouillon | 1230 | 1452 | · | ∞ | | |
| | 10 | 18 Stunden nach d. Behandlung | Aktiv | 274 | 33 | 16 | 0 | 0 | 0,000 16 |
| | 11 | | " | 404 | 61 | 39 | 0 | | |
| | 12 | | Inaktiv | 252 | 102 | 62 | 0 | | |
| | 13 | | " | 288 | 82 | 10 | 0 | | |
| | 14 | | Bouillon | 322 | 380 | 402 | ∞ | | |
| | 15 | 48 Stunden nach d. Behandlung | Aktiv | 16 | 12 | · | 0 | 0,2 | Zwisch. 1 : 20 000 und 1 : 50 000 |
| | 16 | | " | 24 | 14 | · | 0 | | |
| | 17 | | Inaktiv | 8 | 8 | · | 0 | | |
| | 18 | | " | 26 | 24 | · | 0 | | |
| | 19 | | Bouillon | 14 | 10 | · | ∞ | | |
| B 18 Staphylokokkenbouillon 0,25 ccm, Neosalvars. 0,02 g p. kg | 1 | Vorher | Aktiv | 28 | Subtilis | · | ∞ | 0,1 | 0 |
| | 2 | | Inaktiv | 30 | 70 | · | ∞ | | |
| | 3 | 5 Stunden nach d. Behandlung | Aktiv | 35 | 9 | · | 0 | 0,15 | Zwisch. 0,00005 und 0,00002 |
| | 4 | | " | 5 | 3 | · | 2 | | |
| | 5 | | Inaktiv | 23 | 30 | · | 0 | | |
| | 6 | | " | 32 | 56 | · | 0 | | |
| | 7 | | Bouillon | 30 | 50 | · | ∞ | | |
| | 8 | 24 Stunden nach d. Behandlung | Aktiv | 292 | 900 | · | ∞ | 0,15 | 0 |
| | 9 | | " | 308 | 1112 | · | ∞ | | |
| | 10 | | Inaktiv | 277 | 440 | · | ∞ | | |
| | 11 | | " | 360 | 750 | · | ∞ | | |
| | 12 | | Bouillon | 632 | ∞ | · | ∞ | | |

In den Röhrchen wurde jeweils 1 ccm Serum aktiv oder $^{1}/_{2}$ Stunde bei 56° erhitzt mit 0,1 ccm einer Kochsalzlösung beschickt, die im Kubikzentimeter $^{1}/_{100000}$ Öse enthielt. Nach Bebrütung bei 37° wurden innerhalb bestimmter Zeitabstände jedem Röhrchen 0,1 ccm entnommen und zu Gelatineplatten ausgegossen.

Nach Behandlung von Kaninchen *mit hohen Dosen Neosalvarsan* (0,3 g p. kg) weist das Serum der Tiere eine gegenüber der Normalbactericidie *deutlich verstärkte entwicklungshemmende Wirkung gegenüber Staphylokokken auf*. Diese erreicht ihren *Höhepunkt* ganz entsprechend den oben geschilderten Reagensglasversuchen *erst nach 24 stündiger* Einwirkung. Auch *18 Stunden und selbst 48 Stunden* nach der Behandlung besitzt das *Serum* noch *deutliche entwicklungshemmende Wirkung auf Staphylokokken*, die sich durch ihr langsames Anschwellen auszeichnet und die zwanglos als Salvarsanwirkung aufgefaßt werden kann, da die in den Serumproben 5, 18, 48 Stunden nach der Behandlung colorimetrisch nachweisbaren Salvarsanmengen nach unseren Reagensglasversuchen zu einer gleichartigen Entwicklungshemmung hinreichen.

Bei Anwendung *therapeutischer Dosen von Neosalvarsan* (0,002 g p. kg) zeigt das Serum der Tiere *5 Stunden* nach der Behandlung gegenüber der *Normal*bactericidie ebenfalls *deutliche entwicklungshemmende* Wirkung auf Staphylokokken, die an colorimetrisch nachweisbare Spuren von Salvarsan gebunden ist. *24 Stunden nach der Behandlung hat das Serum diese Eigenschaften bereits verloren.* Wir haben bei Anwendung von 0,2 g p. kg viermal ein gleiches Versuchsergebnis erzielen können. Bei einem Tier trat auch fünf Stunden nach der Behandlung die charakteristische Einwirkung auf Staphylokokken nicht in Erscheinung.

Was die Einflüsse und die Beeinflussung der *Normalbactericidie* im Verlaufe der Salvarsanbehandlung betrifft, so liegen hier die Verhältnisse zu kompliziert, als daß aus unseren Versuchen eine Klärung über die Frage zu erwarten wäre. Wir beschränken uns daher darauf, auf die Möglichkeit hinzuweisen, daß bei der Anwendung toxischer Dosen entsprechend der Hemmung der hämolytischen Komplementfunktion auch eine Beeinflussung der bakteriolytischen Komponenten stattfindet, die sich bei therapeutischen Dosen ebenfalls angedeutet finden könnte.

Aus der Tatsache der geringen und vor allem bald abklingenden entwicklungshemmenden Wirkung des Serums auf Staphylokokken nach der *Injektion von therapeutischen Dosen Neosalvarsan* erklären sich ohne weiteres die ungünstigen Ergebnisse, die durch Salvarsanbehandlung bei der experimentellen Staphylokokkeninjektion des Kaninchens erzielt wurden. Bedenkt man, daß die entwicklungshemmende Wirkung des Salvarsans erst nach 24 Stunden die volle Wirksamkeit entfaltet, in unseren Versuchen aber bereits 24 Stunden nach der Behandlung im Serum kein Salvarsan in einer zur Beeinflussung von Staphylokokken hinreichenden Menge mehr vorhanden





ist, so ist es verständlich, daß die schädigende Wirkung auf die Staphylokokken nur eine ganz oberflächliche und vorübergehende sein kann.

*Bei hohen Dosen Salvarsan* liegen die Verhältnisse etwas anders. Hier ist noch bis zu 48 Stunden nach der Behandlung der Salvarsangehalt des Serums noch so groß, daß er zur Schädigung der Staphylokokken hinreicht. Aber auch hier macht sich der volle Einfluß erst nach 24stündiger Einwirkung bemerkbar. *Dieser nur langsam einsetzenden Schädigung der Staphylokokken aber steht die organotrope Wirkung des Salvarsans gegenüber, die nun ganz im Gegensatz zu der bakteriotropen Wirkung sofort nach der Injektion in Erscheinung tritt.* Die zu dieser Zeit noch nicht stärker geschädigten Staphylokokken werden sich in dem geschädigten Tierkörper um so leichter ansiedeln können. Eine Heilwirkung des Salvarsans unter diesen Versuchsbedingungen auch bei Anwendung sehr hoher Dosen des Salvarsans erscheint aus diesem Grunde also schon unmöglich. So konnten wir in *Blutkulturen* auch bei Anwendung hoher Dosen Salvarsans zu jeder Zeit der Injektionen stets reichliche Keimmengen nachweisen.

Wir glauben überhaupt auf Grund unserer Versuche die Vermutung aussprechen zu können, daß es die *zeitlichen* Unterschiede in *dem Auftreten der organotropen und bakteriotropen Wirkungen sind, die in unseren Versuchen zu einer Beschleunigung des Krankheitsverlaufs führten.* Wir finden in unseren Versuchen zwar bei therapeutischen Dosen nur eine *Andeutung* einer organotropen Wirkung, deren Angriffspunkte aber aus Versuchen mit hohen Dosen deutlich ersichtlich sind. Stellt man sich vor, daß die geringen Schwankungen des Komplementgehaltes nach Behandlung mit therapeutischen Dosen nur der Ausdruck von Schädigungen cellulärer und humoraler Funktionen darstellt, deren Gesamtheit immerhin ein nicht ganz zu vernachlässigendes Defizit von vitalen Kräften ausmachen kann, so darf es nicht als ausgeschlossen gelten, daß in einem so — wenn auch nur in *geringem Umfang* — in wichtigen Funktionen beeinträchtigten *Organsystem die Staphylokokken sich um so leichter ansiedeln als unter normalen Verhältnissen.* Nach Behandlung sowohl mit hohen als auch mit therapeutischen Dosen Salvarsans werden die zeitlichen Unterschiede in der Einwirkung des Mittels auf Tierkörper und Bakterien die Ursache der Beschleunigung des Krankheitsverlaufs bilden können. Damit haben wir zugleich auch eine Erklärung für die Erscheinung, daß in unseren Versuchen ein Parallelismus zwischen der Größe der Salvarsandose und der Krankheitsbeschleunigung nicht bestand. Die Krankheitsbeschleunigung ist nämlich vermutlich bei der Anwendung hoher Salvarsandosen in der Regel keine ausgesprochenere als nach der Injektion therapeutischer Dosen, weil trotz der stärkeren Schädigung des Organismus durch die stärkere Salvarsankonzentration nun demgegenüber die

Vermehrungsmöglichkeit der Staphylokokken — bei der Anwesenheit größerer Salvarsanmengen — ebenfalls eine geringere sein wird.

Herrn Geheimrat *Hahn* danke ich ergebenst für die Überlassung des Themas, Herrn Privatdozent *Olsen* für seine dauernde Unterstützung während der Ausführung dieser Arbeit.

## Zusammenfassung.

Es wird die krankheitsbeschleunigende Wirkung der intravenösen Neosalvarsanbehandlung bei der experimentellen Staphylokokkeninfektion des Kaninchens bei gleichzeitiger Infektion und Behandlung untersucht und in der Mehrzahl der Fälle nachgewiesen. Es wird versucht, den für die Erkenntnis des Wesens der Salvarsanwirkung wichtigen Vorgang auf die Eigentümlichkeiten der organotropen Wirkungen des Salvarsans auf der einen Seite, der entwicklungshemmenden Wirkung auf den Erreger andererseits zurückzuführen. Als organotrope Wirkungen des Salvarsans finden sich bei Anwendung hoher Dosen Präcipitatsbildungen im Serum, Hemmung der hämolytischen Komplementfunktion des Serums, Verzögerung der Blutgerinnung. Die Hemmung der hämolytischen Komplementfunktion findet sich nach Behandlung mit therapeutischen Dosen angedeutet. Die bakteriotrope Wirkung des Salvarsans auf Staphylokokken äußert sich in einer Entwicklungshemmung, die bei therapeutischen Dosen eine nur vorübergehende und oberflächliche sein kann. Charakterisiert ist die entwicklungshemmende Wirkung durch die *Langsamkeit ihres Auftretens*, das erst nach 24 Stunden seinen Höhepunkt erreicht, während die organotropen Wirkungen sofort in Erscheinung treten. Aus diesen zeitlichen Unterschieden der Einwirkung auf Tierkörper und Erreger ergibt sich die Möglichkeit, die krankheitsbeschleunigenden Wirkungen des Salvarsans bei gleichzeitiger Infektion und Behandlung so zu deuten, daß die in der ersten Zeit nach der Injektion zunächst weniger geschädigten Staphylokokken sich infolge der *gleich* nach der Injektion sich zeigenden organotropen Wirkungen des Salvarsans um so leichter im Tierkörper ansiedeln.

---

## Literaturverzeichnis.

[1]) *Schiemann*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. **24**; 1915 und *Ishiwara*, Zeitschr. f. Hyg. **77**. 1914. — [2]) *Roos*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. **15**. 1912. — [3]) *Völckers*, Inauguraldissertation Freiburg 1921 (vgl. dort Literaturübersicht). — [4]) *Yakimoff* u. *Kohl-Yakimoff*, Münch. med. Wochenschr. 1911, Nr. 49; 1912, Nr. 3. — [5]) *W. Schwartz* u. *P. Flemming*, Ehrlichs Abhandlungen über Salvarsan **1**, 50, 54. — [6]) *Abelin*, Abhandlungen über Salvarsan **5**, 43 und 45. — [7]) *Häussler*, Inauguraldissertation Heidelberg 1914. — [8]) *Lucksch*, Wiener klin. Wochenschr. 1911, Nr. 20.





(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Göttingen [Direktor: Geh. Medizinalrat Professor Dr. *Reichenbach*].)

# Über Bakterienfiltration mit Zsigmondy-Bachmann-Filtern (Membranfiltern).

Von

Dr. med. **Heinrich Meyeringh,**
ehemaligem Assistenten des Instituts.

Mit 4 Textabbildungen.

Im folgenden möchte ich über Untersuchungen berichten, die ich auf Anregung von *Reichenbach* an einer neuen von *Zsigmondy* und *Bachmann* hergestellten Art von Filtern ausgeführt habe. Es handelt sich um Membranfilter, deren Grundstoff aus Nitrocellulose besteht. Fabrikation und Vertrieb der Filter liegen in Händen der Firma de Haën in Seelze bei Hannover. Die Filter stellen sich dar als weißliche, etwa pergamentpapierdicke, in feuchtem Zustande außerordentlich elastische leicht schneidbare Membranen von glatter Oberfläche. Sie müssen feucht aufbewahrt werden, da trockene Filter brüchig und infolge der Entquellung durchlässiger werden. Entsprechend dem Charakter des Grundstoffes, der Nitrocellulose, sind die Filter überdies im Trokenzustande feuergefährlich. Sie kommen in geteerten, wasserdichten, runden Pappkartons von 6,5 cm Höhe und 16,5 cm Durchmesser zum Versand.

Wenn man die Form der Filter mit den in der *Berkefeld*- und *Chamberland*-Filtrationstechnik gebräuchlichen Typen vergleicht, so liegt von vornherein die Vermutung nahe, daß die Adsorptionswirkung, die bei der Filtration durch Kieselgur- und Porzellanfilter eine ganz erhebliche Rolle spielt, bei Verwendung dieser Filter wahrscheinlich mehr in den Hintergrund tritt. Kieselgur und Porzellan sind zwei außerordentlich adsorptionsfähige Körper. Die adsorptiven Kräfte dieser Grundstoffe werden für die Filtration besonders gut ausgenutzt, wenn sie auf möglichst großen Oberflächen ihre Wirkung entfalten können. Diese Anforderung erfüllen die in der *Berkefeld*- und *Chamberland*-Filtrationstechnik gebräuchlichen dickwandigen Filterkerzen. Die Poren solcher Filter können das Volumen der Testbakterien unter Umständen getrost um das Vielfache überschreiten, das Filtrat kann dennoch keimfrei sein. Ein recht beträchtlicher Teil der Filterwirkung ist hier eben auf Konto der Adsorption zu setzen. Ganz anders liegen die Dinge beim Membran-



filter. Hier passiert das Filtrat eine nur papierdünne Filterschicht. Für Adsorptionswirkung sind also die Verhältnisse denkbar ungünstig gestaltet. Demnach muß die Fähigkeit dieser Filter, keimfrei zu filtrieren, in einem viel höheren Maße als bei Verwendung der *Berkefeld-* und *Chamberland*-Filter von der Weite der einzelnen Poren abhängig sein.

Es ergab sich bald, daß die Beantwortung der Frage, ob die Membranfilter in der Bakteriologie und damit zugleich auf dem verwandten Gebiete der Hygiene mit Erfolg verwendet werden konnten, abhängig gemacht werden mußte einmal davon, ob technisch überhaupt die Möglichkeit zu schaffen war, die Porenweite der Filter mit Sicherheit innerhalb bestimmter Grenzen zu halten, und zweitens davon, ob es möglich zu machen war, mit einer bestimmten Methodik die Porenweite der fertig gestellten Filter genau zu prüfen und für jedes einzelne Filter festzulegen. Nach Erfüllung dieser Vorbedingungen kam es darauf an, eine für die Bakterienfiltration im allgemeinen und für die Filtration bestimmter Arten im besonderen geeignete *maximale Porenweite* zu ermitteln, die sich ergeben mußte aus einer Reihe von Filtrationsversuchen mit verschiedenen Testobjekten und mit Filtern verschiedener Porengröße. Unter *maximaler Porenweite* verstehe ich dabei die Weite der größten Poren eines Filters.

Weiterhin waren für die Beurteilung der Filter Untersuchungen wichtig, die sich mit der Frage des Durchwachsenwerdens der Filter beschäftigten, da wiederholt in der Literatur darauf hingewiesen ist, daß gleiche Filter in Filtrationsversuchen völlig keimfrei filtrierten, während sie in Durchwachsversuchen bei Verwendung desselben Testmaterials die Bakterien passieren ließen.

Neben dem Ausfall der in dieser Richtung angesetzten Versuche mußte als nicht zu unterschätzender Faktor für die Beurteilung der Frage, ob die Filter auch als Wasserfilter zweckmäßige Verwendung finden könnten, die Filtrationsgeschwindigkeit, sowie der Geschwindigkeitsrückgang bei Filtration größerer Mengen Wassers mit herangezogen werden. Ferner war das Verhalten der Filter gegenüber der Dampfdesinfektion, die bei Bakterienfiltrationsversuchen allein in Frage kommt, zu prüfen. Die Verwendung chemischer Desinfizienten würde die Gefahr mit sich gebracht haben, das klare Bild des Filtrationsresultates zu verwischen dadurch, daß das am Filter haftenbleibende Desinfiziens in irgendeiner Art schädigend auf die Testbakterien einwirken konnte.

Bevor ich zu meinen Resultaten übergehe, gebe ich zunächst eine kurze Übersicht über die Versuchstechnik. Für die ersten Versuche benutzte ich unter anderem einen Apparat, der mir freundlicherweise von Herrn Prof. *Rosenthal* zur Verfügung gestellt wurde. Eine genaue Beschreibung des Apparates findet sich im Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig., **45**, 563. 1908.



Der Apparat besteht aus einem Metalltrichter, der durch Einschrauben eines zylinderförmigen Aufsatzstückes in eine Kammer verwandelt wird, welche nach oben durch ein Bleirohr mit einer Luftpumpe in Verbindung steht, mittels deren in der Kammer ein Überdruck bis zu 4 Atmosphären erzeugt werden kann. Nach dem Ablauf zu wird die Kammer durch das eingefügte Filter abgeschlossen. Die periphere Abdichtung wird durch Einschaltung eines dicken, weichen Gummiringes erzielt. Der Ablauf wird mit einer eventuell graduierten, reagensglasartigen Vorlage verbunden. Der Durchmesser der filtrierenden, kreisrunden Filterfläche beträgt 4 cm.

Der Apparat arbeitete zuverlässig und lieferte mir bereits den Beweis, daß die Möglichkeit bestand, mit *Zsigmondy-Bachmann*-Filtern keimfreie Filtrate zu erzielen. Er ist zu empfehlen für Versuche an kleinen Flüssigkeitsmengen. Da mir jedoch daran lag, möglichst große Filterflächen zu prüfen, um nicht auf Grund günstiger Zufallsbefunde an kleinen Filterausschnitten Gefahr zu laufen, mir ein falsches Urteil zu bilden, da mir ferner daran lag, größere Mengen von Filtrat zu erzielen, für deren Gewinnung der *Rosenthal*-Apparat in Anbetracht seiner kleinen Filterfläche nicht geeignet war, ging ich zu anderen Apparaten über, die mir von der Firma Winkel in mannigfachen Formen zur Verfügung gestellt wurden.

Die von mir verwendeten Apparate zerfallen in drei Gruppen, und zwar in Tauchapparate, Standgefäßapparate und Trichterapparate. Mit Tauchapparaten habe ich wenig Erfahrung gesammelt. Sie können nur da Verwendung finden, wo sehr große Flüssigkeitsmengen zur Verfügung stehen, da der untergetauchte Apparat völlig von Flüssigkeit bedeckt sein muß. Die beiden von mir benutzten Apparate bestanden aus Hartgummi. Sie lieferten *einmal* keimfreie Filtrate, versagten aber schon nach der zweiten Dampfdesinfektion, da unter der Einwirkung der Hitze Verziehungen der Hartgummimasse zustande gekommen waren, durch welche massenhaft Bakterien hindurch passieren konnten. Mehr noch als bei den gleich zu beschreibenden Apparaten kommt es bei den Tauchapparaten auf die periphere Abdichtung an. Ist diese nicht absolut einwandfrei, so ist den Bakterien, inmitten derer ja der Apparat untergetaucht ist, Tür und Tor geöffnet. Unter der Einwirkung des negativen Druckes passieren sie mit Leichtigkeit die kleinsten Undichtigkeiten. Die Filtrate sind dann auch bei Verwendung absolut sicherer bakteriendichter Filter nie steril. Nach den Resultaten meiner mit anderen Apparattypen vorgenommenen Untersuchungen kann es trotzdem nicht schwer sein, zweckmäßige, bakteriendichte Tauchapparate herzustellen. Ihre Verwendung würde am Platze sein, wo es sich z. B. darum handelt, vorhandenes infektionsverdächtiges Trinkwasser rasch zu entkeimen, wenn eine Kochgelegenheit nicht zur Hand ist. Eine solche Situation könnte z. B.



im Kriege oder auf Forschungsreisen gegeben sein. So ist denn auch während des Krieges ein kleiner Versuchstauchapparat entstanden. Leider sind praktische Erfahrungen nicht gesammelt worden. Allerdings dürfte es schwer sein, eine Truppe so zu disziplinieren, daß ihr aus der Benutzung des Apparates ein wesentlicher Vorteil erwächst. Immerhin ist die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß man durch Schaffung einer solchen Vorsichtsmaßnahme zur Herabsetzung der allgemeinen Infektionsgefahr etwas beitragen kann. Doch würde es über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen, dieses Problem eingehender zu erörtern. Für Verwendung auf Forschungsreisen scheint mir der Tauchapparat mit seinen Membranfiltern um so geeigneter zu sein, als man zunächst die Möglichkeit hat, beliebig große Mengen von Filtern mit sich zu führen, ohne daß dieselben viel Platz wegnehmen. Man kann die Größe der Apparate und damit auch ihre Ergiebigkeit beliebig variieren. Es dürfte so nicht schwer sein, auch eine größere Zahl von Menschen hinreichend mit Trinkwasser zu versorgen, welches dann nicht nur entkeimt, sondern auch von seinen Schwebestoffen befreit ist, eine Tatsache, die dem filtrierten Wasser in bezug auf seine Appetitlichkeit unbedingt den Vorrang vor dem gekochten Wasser geben würde. Zur Entscheidung der Frage, ob die Filter auf diesem Gebiete und in diesen Apparaten Zufriedenstellendes leisten, bedarf es jedoch zunächst praktischer Erfahrung. Theoretisch müßten die Tauchapparate nach den weiter unten zu besprechenden Ergebnissen meiner Arbeit auch hohen Anforderungen gerecht werden können. Da sie für Laboratoriumszwecke und Wasserfiltration im großen m. E. nicht in Frage kamen, überdies das Aufbringen der erforderlichen großen Mengen flüssiger Nährböden bald zu kostspielig geworden wäre, habe ich mit den Tauchapparaten keine weiteren Versuchsreihen angesetzt.

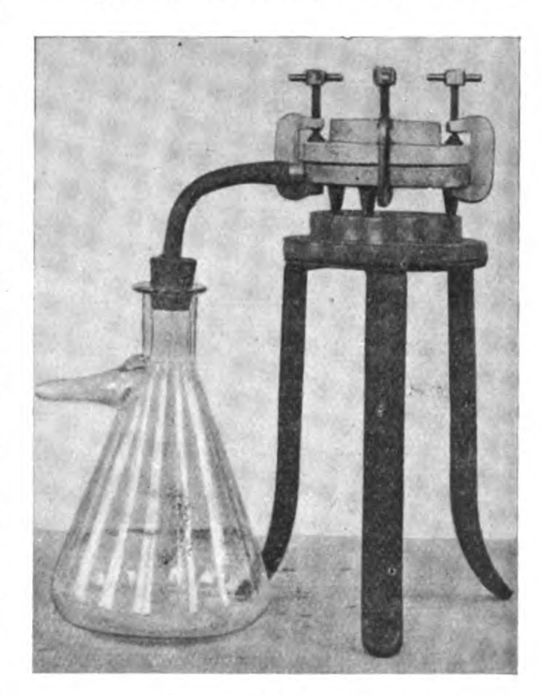


Abb. 1.

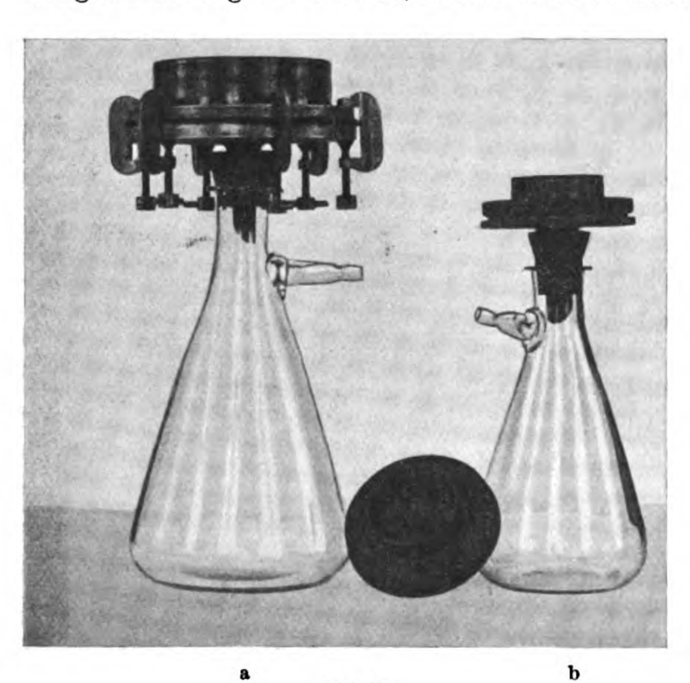
Die Standgefäßapparate — eine Form ist in Abb. 1 abgebildet — haben den Nachteil, daß das Filtrat nach Passieren des Filters nicht gleich in das Ablaufgefäß hineingelangt, sondern zunächst ein kurzes Metall-Glas-



Gummi-Rohr-System passieren muß. Dementsprechend ist auch der Aufbau des ganzen Filterapparates schwieriger und zeitraubender, als wenn die Filterapparate den Vorlagen direkt aufsitzen. Ich habe auch diesen Typ verlassen und bin zu *Trichter*apparaten übergegangen, die sich bewährt haben und mittels deren meine definitiven Resultate gewonnen worden sind.

Ich gebe im folgenden eine kurze Beschreibung dieser Apparate und einen Überblick über die Versuchstechnik.

Der in Abb. 2b abgebildete Apparat besteht aus drei Teilen: 1. einem unteren Trichterstück, dessen äußere zylindrische Fläche ein Schraubengewinde trägt. Die obere, 5 cm im Durchmesser messende Fläche, die im folgenden als Filtratablauffläche bezeichnet wird, ist geriffelt. Auf diese Weise wird ein direktes Anlegen des übergelagerten Filters an die Unterlage verhindert. Die Riffelungen stellen ein Kanalsystem dar, welches den leichten Ablauf des Filtrates gewährleistet. Von der Peripherie zum Zentrum hin zeigt die Ablauffläche ein leichtes Gefälle. Das nach dem Zentrum zu fließende Filtrat entleert sich durch das Trichterrohr. Die 1 cm breite Randpartie der Filtratablauffläche ist plan geschliffen. Sie stellt den für die Abdichtung wesentlichen Teil des unteren Trichterstückes dar. Die äußerste Peripherie dieser Fläche ist randartig erhöht und enthält an zwei gegenüberliegenden Stellen einen kleinen Einschnitt.



a b
Abb. 2.

2. einem Filteraufsatz: Der Filteraufsatz besteht aus einem unteren, 1 cm breiten, an der Unterfläche plan geschliffenen Abschlußring und aus einem aufgesetzten kurzen Zylinder. Der Abschlußring trägt an zwei sich gegenüberliegenden Stellen zwei kleine Sporne, welche in die oben erwähnten Einschnitte des unteren Filterstückes hineingreifen. Auf diese Weise wird eine Fixierung des Filteraufsatzes in dem Sinne erzielt, daß dieser beim Anziehen des abschließenden Schrauben-

ringes sich in der Rotationsrichtung dieses Ringes nicht mitbewegen kann. So wird eine Verziehung des abdichtenden Gummiringes und eine Beschädigung des inneren Filterrandes vermieden.

3. einem abschließenden Ring, welcher ein auf das Gewinde des unteren Trichterstückes passendes Muttergewinde trägt. An seinem oberen, inneren Rande fängt der Ring breit über und übt so beim Anziehen einen Druck auf den Filteransatz aus, wodurch die feste Vereinigung von oberem und unterem Trichterstück bewirkt wird.

Das zurechtgeschnittene Filter wird der Filtratablauffläche direkt angelegt. Dann wird ein abdichtender weicher Gummiring mit glatter Oberfläche aufgelegt, der Filteraufsatz aufgesetzt und unterer und oberer Teil durch Aufsetzen und Anziehen des überfangenden Ringes fest vereinigt. Der Flüssigkeit bleibt so nur der eine Weg, nämlich der Weg durch das Filter hindurch.

Ein zweiter Typ (Abb. 2a) unterscheidet sich von dem beschriebenen nur durch seine Größe und die Art des Verschlusses, der hier durch mehrere Schrauben vermittelt wird. Es ist wesentlich, diese Schrauben gleichmäßig anzuziehen, da sonst durch Verziehungen am Apparate selbst Undichtigkeiten entstehen können.

Ausschlaggebend für ein einwandfreies Arbeiten dieser Apparate ist die Beschaffenheit der abdichtenden Gummiringe. Hier muß man die Forderung aufstellen, daß nur weiches, ziemlich dickes Gummi mit glatter Oberfläche zur Verwendung kommt. Je größer die Elastizität, um so sicherer die Abdichtung. Jede Riffelung der Oberfläche, besonders bei wenig elastischem Gummi birgt die Gefahr in sich, daß trotz festen Anziehens der Schrauben capilläre Räume zwischen Gummi und oberem wie unterem Abschlußring bestehen bleiben, die miteinander kommunizieren, die Bakterien passieren lassen und so eine Undichtigkeit des Filters vortäuschen. Durch diese Störung wurde im Anfang das Fortschreiten meiner Arbeit erheblich aufgehalten. Die seinerzeit gelieferten Gummiringe waren hart, dünn und von geriffelter Oberfläche; bessere Qualitäten waren nur mit großen Schwierigkeiten zu erhalten. Als sie mir zur Verfügung standen, kam, nachdem überdies noch andere gleich zu erörternde Schwierigkeiten beseitigt waren, Regelmäßigkeit in die erzielten Resulsate.

Hier möchte ich noch einmal darauf hinweisen, daß Apparate aus Hartgummi, die ich u. a. im Anfang verwendet habe, abzulehnen sind, da sie die Dampfdesinfektion nicht vertragen. Es entstehen Verziehungen der Hartgummimasse, ein Umstand, welcher zu Undichtigkeiten des Apparates führt und so die Keimfreiheit des Filtrates in Frage stellt.

Die gebrauchsfertigen Trichterapparate werden mittels eines über den Trichterstiel geschobenen Gummistopfens luftdicht auf Vakuumflaschen aufgesetzt, dann die gesamte Apparatur $^3/_4$ Stunden in strömendem



Dampf sterilisiert. Dabei ist wichtig, daß die Filter in feuchtem Zustande in den Desinfektionsapparat hineinkommen und daß nach beendigter Sterilisation wegen der Gefahr der Porenveränderung eine Austrocknung der Filter vermieden wird. Ich habe deswegen nach der Herausnahme aus dem Desinfektionsapparat die Filter sofort mit steriler physiologischer Kochsalzlösung angefeuchtet. Da unter der Einwirkung der Hitze die Volumverhältnisse des Metalles sich ändern, darf man nicht unterlassen, nach Abkühlung der Apparate die Verschlußschrauben noch einmal fest anzuziehen.

Die sterilisierte Apparatur wird nun mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden. An die Wasserstrahlpumpe ist ein Manometer angeschaltet, welches die Höhe des erzeugten negativen Druckes angibt, unter dem filtriert wird. Der Durchschnittsdruck bei meinen Versuchen betrug 60 mm Quecksilber.

Die Bakterienaufschwemmungen habe ich so gewählt, daß etwa vier Ösen einer Reinkultur auf $^1/_2$ Liter Flüssigkeit kamen. Die mit einer solchen Bakterienmenge versetzten Flüssigkeiten sind deutlich getrübt. Als Substrat habe ich in meinen Versuchen im allgemeinen mit Bouillon versetzte physiologische Kochsalzlösung, Peptonlösung oder Bouillon und Kombinationen dieser Nährböden verwendet, je nach der Art der Testbakterien. Maßgebend für die Auswahl war die Absicht, die Bakterien in einem Substrat aufzuschwemmen, welches den jeweiligen Testobjekten ein willkommener Nährboden war.

Zu Kontrollzwecken wurde ein Teil des Nährsubstrates mit kleinen Mengen der Testbakterien beimpft und bebrütet. Die Kontrollen sind stets gewachsen.

An Bakterien habe ich Staphylokokken, Coli, Typhus, Ruhr, Cholera und Spirillum parvum filtriert. Mehrere Versuchsreihen brachten zunächst manche Enttäuschung. Die eingangs erwähnte Vorbedingung, Prüfbarkeit der Porenweiten, war nicht erfüllt. Die Dichte der Filter wurde vielmehr bestimmt aus der Filtrationsgeschwindigkeit, und diese Tatsache erschwerte die richtige Beurteilung außerordentlich, wie gleich ersichtlich wird. Die Firma de Haën versah die Filter mit Zahlen, die aus der Filtrationsgeschwindigkeit abgeleitet waren, und mir verblieb lediglich die systematische Prüfung der nach ihren Dichten abgestuften Filter. Die Resultate waren zum großen Teil günstig. Und wenn ich nicht große Versuchsreihen angestellt hätte, wäre ich vielleicht schon damals zu einer ebenso günstigen Beurteilung gekommen wie *Eichhoff*, der auf Grund seiner Versuche zu dem Schlusse kam, daß die Filter einwandfrei bakteriendicht seien. Die Befunde *Eichhoffs* können nur günstige Zufallsbefunde gewesen sein. Ich habe zahlreiche Filter dieser Epoche — es war im Sommer 1920 — untersucht und festgestellt, daß sie keineswegs durchweg bakteriendicht waren.



In 12 Versuchen mit Coli, Staphylokokken und Spirillum parvum erwiesen sich die Filter als dicht 12 mal für Staphylokokken, 9 mal für Coli und 1 mal für Spirillum parvum. Dem letzteren Ergebnis habe ich keine größere Bedeutung beigemessen, da Spirillum parvum, auf dessen Verhalten ich nachher noch kurz zurückkomme, auch in den von *Esmarch*schen Versuchen mit *Berkefeld*-Filtern und anderen Filterarten durch die Filter hindurchging, die im übrigen absolut bakteriendicht waren.

Aber dreimal ging in meinen Versuchen Coli durch. Dieser Befund war um so wesentlicher, als von seiten der beteiligten Firmen de Haën und Winkel unter anderem eine Verwendung der Filter zur Wasserfiltration projektiert war, ein Anwendungsgebiet, für das zum mindesten absolute Dichtigkeit der Filter gegenüber der Coligruppe gefordert werden mußte. Erschwerend für die Beurteilung dieser orientierenden Versuche wirkte der Umstand, daß Coli nicht etwa in den drei durchlässigsten Filtern auftrat. Im Gegenteil, ausgerechnet zwei der dichteren Filter hatten Coli passieren lassen. In einem dritten Versuch verwandte ich in verschiedenen Apparaten zwei aus dem gleichen Filter geschnittene Filterscheiben; die eine Scheibe filtrierte steril, die andere ließ Coli durch.

Es war durch diese Versuche bewiesen, daß an sich die Möglichkeit vorlag, in der Filterfabrikation auf dem beschrittenen Wege bakteriendichte Filter herzustellen, die Garantie aber, daß alle gelieferten Filter dicht waren im bakteriologischen Sinne, konnte die liefernde Firma nach diesen Resultaten nicht übernehmen. Ohne diese Garantie aber war an den Versuch einer Einführung der Filter in die Gebiete der Hygiene und Bakteriologie nicht zu denken.

Wie sollte man sich nun die verschiedenen Ergebnisse erklären? Bei richtiger Bewertung der erwähnten Resultate in den Versuchen mit Bacterium coli mußte ich zunächst an einen übersehenen Defekt in der Filtermasse denken; eine diesbezügliche Nachuntersuchung der drei Filter war erfolglos.

Also kam nur eine Unregelmäßigkeit in der Porenweite in Frage, und zwar mußten die langsamer filtrierenden, also dichteren Filter in meinen Fällen weitere Poren gehabt haben als die weniger dichten, rascher filtrierenden. Von der Porenweite aber hing ab die Dichte im bakteriologischen Sinne. Diese bakteriologische Dichte durfte demnach unter keinen Umständen mehr in Parallele gesetzt werden zu der Dichte, die an der Filtrationsgeschwindigkeit gemessen war. Bei einfacher Überlegung ist es ja ohne weiteres klar, daß die Filtriergeschwindigkeit in der Tat unter keinen Umständen ein Maßstab für Porenweite sein kann. Nehmen wir an, es wäre praktisch möglich, eine Filtermasse herzustellen, die vollständig gleich weitporig wäre, sich aber in bezug auf Poren*zahl* verschieden verhielte, so würde bei gleicher Porenweite ein porenreicheres Filter



erheblich rascher filtrieren als ein solches mit weniger Poren, aber gleicher Porenweite. Es wäre falsch, infolge der langsameren Filtrationsgeschwindigkeit das weniger porenhaltige Filter als engporiger zu bezeichnen. Oder nehmen wir ein anderes Beispiel. Die Porenweite der einzelnen Poren eines Filters ist verschieden — ein Zustand, wie er übrigens den tatsächlichen Verhältnissen der Filter entspricht —, das eine Filter liefert innerhalb einer Minute 5 Liter Wasser, das andere 1 Liter. Dieses letztere wäre demnach als das dichtere zu betrachten. Nun ergibt aber das erste Filter mit größerer Filtriergeschwindigkeit ein steriles Filtrat, während das Filtrat des letzteren starkes Bakterienwachstum erkennen läßt. In diesem Falle kann man sich die Dinge so erklären, daß das erste schneller filtrierende Filter außerordentlich reich ist an Poren von einem Durchmesser, welcher den Bakterien einen Durchtritt nicht gestattet, während in dem anderen Filter die Porenverhältnisse so liegen, daß diese in ihrer großen Masse erheblich enger sind als die Poren des eben erwähnten Filters, andererseits aber vereinzelt die zulässige maximale Porenweite überschreiten. Diese wenigen Poren machen den Erfolg der Filtration illusorisch, da sie für die Bakterien durchgängig sind, und einige durchgegangene Mikroorganismen genügen, um den Effekt der Filtration zu beseitigen. *Die Filtrationsgeschwindigkeit ist also abhängig von der Summe der Porenlumina, die bakteriologische Dichte aber von der Weite der größten Poren.*

Aus diesen Ausführungen dürfte hervorgehen, daß nunmehr die eingangs erwähnten Fragen akut wurden, ob es überhaupt möglich zu machen war, die Filtermasse so herzustellen, daß ihre Porenweite ein bestimmtes Maximum sicher nicht überschritte und zweitens, ob es möglich war, die Filter exakt auf Porenweite zu prüfen.

Es traf sich günstig, daß, als meine Arbeiten hier gewissermaßen auf einem toten Punkt angelangt waren, die Konstruktion eines Apparates beendet wurde, der zur Prüfung der Porenweite verwendet werden sollte. Diesen Apparat stellte mir Herr Prof. *Zsigmondy* liebenswürdigerweise zur Verfügung, so daß ich nunmehr die Weite der größten Filterporen für jedes Filter feststellen konnte. Der Apparat lehnt sich an das von *Bechhold* für seine Filter ausgearbeitete Luftdruckprüfungsverfahren an.

Bekanntlich steigt eine Flüssigkeit in einer vollkommen benetzten Capillare bis zu einer gewissen Höhe auf, welche vom Radius der Capillare, der Oberflächenspannung und dem spezifischen Gewicht der Flüssigkeit abhängt und als „capillare Steighöhe“ bezeichnet wird. Das Aufsteigen der Flüssigkeit kann durch Anwendung eines bestimmten Gegendruckes verhindert werden. Der gleiche Druck ($p$) wäre anzuwenden, wenn man Luft durch ein mit Flüssigkeit erfülltes Haarröhrchen pressen wollte. Mit einer gewissen Annäherung darf man voraussetzen, daß ein Filterkörper von zahlreichen solchen Capillaren durchsetzt ist. Ebenso

wie man nun in der Lage ist, bei bekannter Oberflächenspannung (Capillarkonstante $= \beta$) und bekanntem Druck den Durchmesser einer einzigen Capillare zu bestimmen, kann man auch ein Urteil gewinnen über die Porengrößen eines Filters. Man hat nämlich zu deren Ermittlung nur den Druck zu bestimmen, welcher erforderlich ist, um Luft durch ein z. B. mit Wasser erfülltes Filter hindurchzupressen. Dabei erhält man nach der Formel

$$D = \frac{4\,\beta}{p \cdot 1{,}033 \cdot 10^4}$$

den Durchmesser der größten in dem Filter enthaltenen Capillaren bzw. Poren. In der Formel bedeuten $\beta$ die Capillarkonstante, welche bei 18° für Wasser etwa 7,7 ist, $p$ den Luftdruck. Diese Größen sind in Millimetern und Milligrammen zu rechnen. Die im folgenden gegebene Tabelle veranschaulicht die verschiedenen Drucken entsprechende maximale Porenweite von Filtern:

| | |
|---|---|
| 1 Atm. | = 2,98 μ |
| 1,2 „ | = 2,5 „ |
| 1,5 „ | = 2,0 „ |
| 2,0 „ | = 1,5 „ |
| 2,5 „ | = 1,2 „ |
| 3,0 „ | = 1,0 „ |
| 4,0 „ | = 0,75 „ |
| 5,0 „ | = 0,6 „ |

Die Filterprüfung mit Druckluft gestattet nur die allergrößten Poren eines Filters zu erkennen. Die Durchschnittsporengröße hingegen wird auf diesem Wege nicht erhalten. Auf viele Millionen feiner Poren kommen nur wenige größere selbst dann, wenn zahlreiche Luftbläschen vom Filter aufsteigen. Die gröberen Poren sind gewissermaßen als Fehler in einem viel feinporigeren Filtermaterial anzusehen. Ihre Ermittlung ist bakteriologisch von großer Wichtigkeit, denn durch diese die Durchschnittsweite der Poren weit überschreitenden Lumina wird die Bakteriendichte auch der noch so langsam filtrierenden Filter aufgehoben.

Praktisch geht der Prüfungsversuch in folgender Weise vor sich. Zunächst der Apparat (Abb. 3): Er besteht aus einer Kammer mit starken gußeisernen Wänden und einem Deckel aus Aluminiumbronze, dessen kreisförmiger äußerer Ring mittels kräftiger Schrauben der Kammer fest aufgepreßt werden kann. Die vom Ring umschlossene Kreisfläche ist durch mehrere metallene Sektoren, die mit dem Ring in organischer Verbindung stehen, rinnenförmig eingeteilt, an ihrer Innenfläche überdies von einem Drahtnetz überzogen, welches eine gleichmäßige Belastung des Filters durch den Innendruck gewährleistet. Der ganze Apparat ist mit einer einfachen Luftpumpe und einem Manometer verbunden. Das angefeuchtete Filter wird nun unter Einschaltung eines an der dem Luftdruck ausgesetzten Fläche abdichtenden Gummiringes





zwischen Deckel und Kammer geschaltet, der Deckel fest angeschraubt. Um einen Indicator für den ersten Moment des Luftdurchtrittes zu haben, wird die Oberfläche des Filters mit Wasser übergossen. Nun wird gepumpt unter ständiger Beobachtung von Manometer und Wasserspiegel, und im Moment des ersten Luftdurchtrittes, der sich durch rasch aufeinander folgendes Auftreten von Bläschen bemerkbar macht, der Manometerstand abgelesen. Aus der rechnerisch ermittelten Tabelle ergibt sich dann ohne weiteres die Porenweite.

Mit diesem Apparat habe ich sämtliche von mir verwendeten Filter geprüft und fand meine oben geäußerte Annahme über die Porenverhältnisse bestätigt. Es bestanden keinerlei regelmäßige Beziehungen zwischen Filtrationsgeschwindigkeit und maximaler Porenweite. Es gibt Filter, die bei einem Druck von zwei Atmosphären und einer Filterfläche von

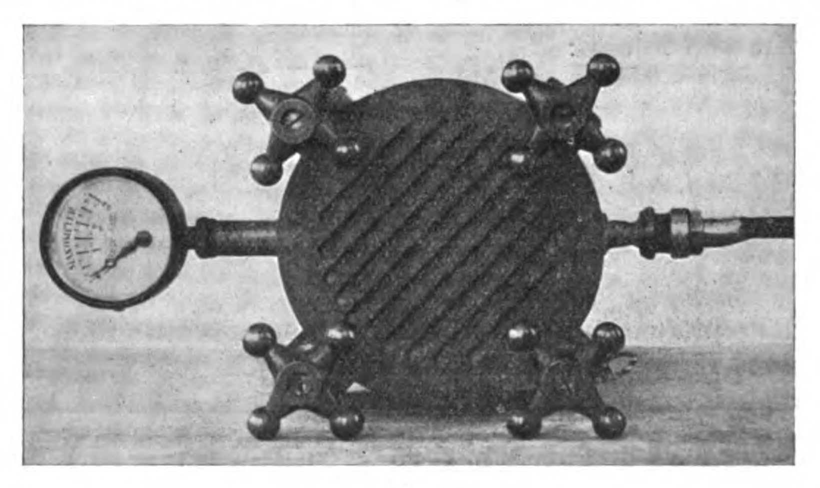


Abb. 3.

100 qcm in 15 Sekunden einen Liter Wasser liefern, deren maximale Porenweite kleiner ist als 1 $\mu$ und solche, durch die ein Liter Wasser innerhalb von 70 Sekunden hindurchfiltriert, deren maximale Porenweite aber 2,5 $\mu$ beträgt. Die Dichte im bakteriologischen Sinne steht demnach in diesen Fällen im umgekehrten Verhältnis zur Filtrationsgeschwindigkeit. Hieraus geht zur Genüge hervor, daß man ohne den von *Zsigmondy* konstruierten Apparat niemals zum Ziele gekommen wäre.

Für meine Versuche wählte ich, soweit es möglich war, solche Filter, welche maximale Poren in möglichst großer Menge enthielten. Auf diese Weise verbesserten sich die Aussichten, zu einer richtigen Erkenntnis der für die Filtration zulässigen maximalen Porenweite zu gelangen; denn je größer die Zahl dieser maximalen Poren war, um so sicherer mußten bei der Filtration die Bakterien die Poren passieren, wenn diese die wirksame Porenweite überschritten. Die filtrierten Mengen schwankten zwischen 30—200 ccm.

An der Hand zahlreicher Untersuchungen mit einem besonders kleingearteten Colistamm fand ich im Filtrationsversuch für Coli die wirksame Porenweite bei etwa 1,7 μ. Als für die Colifiltration optimales Filter erachte ich demnach unter Berücksichtigung der gleich zu besprechenden Verhältnisse beim Durchwachsversuch ein solches von der maximalen Porenweite von 1,2 μ. Filter dieser Art waren in meinen Versuchen colidicht und können, theoretisch jedenfalls, wenn diese relativ großen Poren in reicher Menge vorhanden sind, zugleich die größtmögliche Filtriergeschwindigkeit entwickeln. Die gleichen Werte treffen zu für Typhus- und Ruhrbacillen.

Ganz andere Werte ergaben sich für Cholera als den Repräsentanten der pathogenen Vibrionen. 1,7-μ-Poren lassen Cholera glatt passieren. Die zur Zurückhaltung nötige Porenweite für Cholera liegt nach meinen bisherigen Untersuchungen etwa zwischen 1 und 1,3 μ. Leider habe ich mich bei der Cholerafiltration nicht auf Versuche mit einem ausgesucht kleinen Stamme beschränkt, sondern mehrere Stämme benutzt, die offenbar Schwankungen in ihrer Größe gezeigt haben. Vielleicht ist hierauf die gewonnene Porenbreite von 1,0—1,3 μ zurückzuführen. In einem Falle passierte ein Stamm sogar ein 1-μ-Filter. Es handelte sich um einen Versuch, in dem ich als Testmaterial ein Gemisch von Coli und Cholera verwendete. In diesem Falle gelang es mir, Bacillen und Vibrionen durch die Filtration zu trennen, ein theoretisch nicht uninteressanter Vorgang. Das in diesem Versuch verwendete Filter zeichnete sich durch einen außerordentlichen Reichtum an Poren aus, von denen bei der Prüfung aber nicht eine einzige unterhalb eines Druckes von 3 Atmosphären für Luft durchgängig war. Wenn in diesem Falle Cholera durchging, so kann man dies, wie ich eben schon erwähnte, nur darauf zurückführen, daß in diesem Versuche ein besonders kleiner Vibrio verwandt wurde, der 1-μ-Poren noch gerade eben passieren konnte. Da ich, wie gesagt, nicht einen bestimmten Cholerastamm verwendete, sondern mit mehreren abwechselte, wäre das durchaus denkbar. Denn Schwankungen in der Größe der einzelnen Vibrionenstämme kommen ja fraglos vor. Leider konnte ich diese Frage nachträglich nicht mehr klären. Die mit 1-μ-Filtern angestellten vier Nachuntersuchungen, bei denen etwa 50 ccm Aufschwemmung filtriert wurde, lieferten keimfreie Filtrate. Unter Berücksichtigung des einmal positiven Befundes von Cholerabacillen im Filtrat bei Benutzung eines einwandfreien 1-μ-Filters erachte ich als optimales Filter für die Cholerafiltration ein solches von der maximalen Porenweite von 0,75 μ, nachdem ich in vier Versuchen mit Filtern, die diesen Anforderungen entsprachen, bei Verwendung von Cholera als Testmaterial keimfreie Filtrate erzielt habe und auch im Durchwachsversuch keine Vibrionen das Filter passierten.



Es besteht demnach ein großer Unterschied in der Filtrierbarkeit von Coli und Cholera. Worauf ist das zurückzuführen? Mit dem Größenunterschiede allein kann diese Tatsache unmöglich erklärt werden. Das von mir verwendete Coli war eine besonders kleine Art, und es bestand kein sinnfälliger Unterschied im Dickendurchmesser dieser beiden Testbakterien. Der Grund für die ganz unverhältnismäßig leichtere Filtration von Cholera muß also auf anderem Gebiete liegen. Vermutlich spielt beim Durchtritt durch die Filterporen die Beschaffenheit der Leibessubstanz des Bacteriums eine Rolle, so zwar, daß unter Wirkung des Druckes, der in die Pore eingetretene Bakterienkörper, wofern seine Leibessubstanz besonders elastisch ist, in die Länge gezogen, sein Dickendurchmesser dadurch zugleich verkleinert wird. Überdies könnte ein solch elastischer Bakterienkörper infolge seiner Fähigkeit sich leicht zu winden und anzuschmiegen die wahrscheinlich vorhandenen vielfachen Windungen der Poren leichter überwinden als ein mehr starrer Mikroorganismus. Man darf wohl mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die geschwungenen lebhaft beweglichen Vibrionen eine solche Elastizität in höherem Maße aufweisen als das erheblich unbeholfenere und morphologisch starrere Coli. So würde sich die erhebliche Differenz zwischen der für die Filtration von Coli und Cholera geeigneten maximalen Porenweite zwanglos erklären lassen.

Einige Versuche mit Staphylokokken ergaben, daß diese schon von Membranfiltern mit einer Porenweite von 2,3 $\mu$ zurückgehalten wurden. Diese Tatsache dürfte begründet sein in der Kugelform der Kokken.

Das kleinste aller bekannten Spirillen, das von *Esmarch* entdeckte Spirillum parvum, welches alle Filter bis zu einer Porenweite von 1 $\mu$ passierte, wurde in vier Versuchen mit Filtern zurückgehalten, welche von der Firma de Haën mit der Bezeichnung $< 0{,}6\ \mu$ zum Versand kommen. Diese Filter halten einen Druck von 5 Atmosphären aus, ohne Luft durchzulassen. Bei Verwendung des $< 0{,}6$-$\mu$-Filters habe ich Spirillum parvum niemals im Filtrat gefunden. Die Versuche mit Spirillum parvum sind deswegen von besonderem Interesse, weil dieses Bacterium auch nach Filtration durch im übrigen sicher keimfrei filtrierende *Berkefeld*- und *Chamberland*-Filter häufig im Filtrat nachzuweisen war, wofern eine genügende Flüssigkeitsmenge filtriert und das Filtrat genügend lange beobachtet wurde. Ob die eben erwähnten Filterarten diese kleinste und beweglichste aller Spirillen zurückhalten oder nicht, ist mehr oder weniger Zufallssache. Bei Verwendung des Filters mit Poren unter 0,6 $\mu$ scheint Spirillum parvum mit Sicherheit zurückgehalten zu werden.

In diesem Zusammenhange darf ich kurz darauf hinweisen, daß man das Filtrat einer Spirillum-parvum-Aufschwemmung mindestens 10 Tage lang beobachten muß. In einem Falle konnte ich erst am 10. Tage die



Spirillen nachweisen, nachdem ich noch am 9. Tage einen negativen Befund erhoben hatte.

Eine technische Unbequemlichkeit will ich nicht verschweigen: sie liegt darin, daß die Filter, wenn sie nach Einspannung in den Trichterapparat im Dampf sterilisiert werden, im Bereich der Abdichtung ziemlich fest mit Gummi und Trichterapparat verkleben, so daß sich das Filter häufig nicht ohne Beschädigung aus dem Apparate herausnehmen läßt. Dadurch, daß ich minimale Mengen Vaselin auf die mit dem Filter in Berührung kommende Gummifläche auftrug, habe ich diesen Übelstand zwar teilweise beseitigen können, hatte aber unter Umständen zu riskieren, daß die Geschwindigkeit der Filtration durch die Verunreinigung der Filteroberfläche mit dem flüssigen Fett erheblich herabgesetzt wurde. Trotzdem möchte ich bei der praktischen Anwendung im Laboratorium die *vorsichtige* Anwendung von Vaselin empfehlen.

Die Ergebnisse der bisher mitgeteilten Versuche lassen sich dahin zusammenfassen, daß die Filter für Laboratoriumszwecke hervorragend geeignet sind. Sie geben — vorausgesetzt daß sie sorgfältig auf Porenweite geprüft sind — mindestens dieselbe Sicherheit wie die bisher gebräuchlichen, sind ihnen aber in der Filtriergeschwindigkeit erheblich überlegen. Sie haben außerdem den Vorteil, daß sich die Porenweite dem jeweiligen Verwendungszweck weitgehend anpassen läßt. Für die Untersuchung und Größenbestimmung ultravisibler Virusarten werden sich so vielleicht neue Möglichkeiten ergeben.

Ein weiterer erheblicher Vorteil liegt darin, daß sich von der glatten, mechanisch sehr widerstandsfähigen Oberfläche der Rückstand sehr viel leichter entfernen läßt als von Kieselgur- und Porzellanfiltern. Deshalb läßt sich durch kräftiges Abwischen mit einem Wattebausch die Durchlässigkeit, wenn sie durch Verstopfen der Poren gelitten hat, wiederherstellen, es läßt sich aber auch der Filterrückstand, wenn man seiner bedarf, leicht gewinnen. Das ist bereits von *Citron* und *Eichhoff* für die Gewinnung von Tuberkelbacillen aus dem Urin, von *Eichhoff* auch für den Nachweis von Typhusbacillen im Wasser benutzt worden. Auch ich selbst habe in einem Urin, der im Zentrifugat nur spärlich Tuberkelbacillen enthielt, durch Anreicherung auf dem Filter sehr große Mengen von Bacillen nachweisen können. Die Methode wird zweifellos für den Nachweis von Bakterien in Flüssigkeiten, insbesondere im Urin und Wasser, große Bedeutung gewinnen können.

Schließlich muß noch als sehr großer Vorzug hervorgehoben werden, daß die Filter wegen ihrer geringen Adsorptionswirkung die Zusammensetzung kolloidhaltiger Flüssigkeiten sehr viel weniger verändern, als es Kieselgur- und Porzellanfilter tun. Eigene Untersuchungen darüber habe ich noch nicht anstellen können, ich darf aber auf eine Arbeit von *Ficker* verweisen, welche dieses Verhalten sehr deutlich beweist. *Ficker* ver-





suchte durch Filtration von Bouillonkulturen des malignen Ödembacillus diesen von seinen Toxinen zu trennen. Er verwandte in diesen Versuchen Kreidefilter nach *Schattenfroh*, Asbestfilter nach *Heim*, Feinfilter von der Firma Mackerey und *Berkefeld*-Filter. Die Kreidefilter hielten Bakterien und meist auch die Toxine zurück, die Asbestfilter waren nach *Fickers* Veröffentlichung für die Giftgewinnung geeignet, filtrierten aber nicht keimfrei, die Feinfilter der Firma Mackerey waren für die Bakterien durchlässig. Mit *Berkefeld*-Filtern erzielte *Ficker* zweimal keimfreie Gifte; in den meisten Versuchen waren die Gifte bei Verwendung dieser Filter stark abgeschwächt oder die Filtrate enthielten gar kein Gift. Als *Ficker* Membranfilter verwendete, erwiesen sich diese als absolut dicht gegenüber den Bacillen des malignen Ödems und ließen das in den Ödemkulturen vorhandene Gift mit einer Regelmäßigkeit durch wie kein anderes Filter. Dem *Zsigmondy-Bachmann*-Filter (Membranfilter) gegenüber war das *Berkefeld*-Filtrat, wenn die Filter überhaupt Toxin durchließen, immer abgeschwächt. Oft wirkten von ein und derselben Giftlösung das *Zsigmondy-Bachmann*-Filtrat sehr stark, das *Berkefeld*-Filtrat überhaupt nicht.

### Dauerversuche mit Leitungswasser.

Eine Reihe weiterer Versuche habe ich angestellt, um zu prüfen, ob sich die Filter *zur Gewinnung von Trinkwasser* verwenden lassen. Es mußte hierbei besonders geprüft werden, wie sich die Durchlässigkeit der Filter und die Keimfreiheit des Filtrates bei dauernder Beanspruchung verhält. Ich habe mich dabei zweier verschiedener Apparate bedient, eines größeren rechteckigen Apparates mit einer filtrierenden Fläche von 172,5 qcm und eines kleineren runden Apparates (Abb. 4a) mit einer filtrierenden Fläche von 106 qcm. Das Dichtungsprinzip ist das gleiche wie an dem großen für die Bakterienfiltration verwendeten Trichterapparate. Auch diese Apparatur wurde vor dem Versuch durch strömenden Dampf sterilisiert, die Abflußrohre wurden durch einen Glasüberfall geschützt, welcher durch einen Wattestopfen verschlossen wurde.

In dem ersten Apparat habe ich infolge Ermangelung einer Luftdruckprüfungsmöglichkeit ungeprüfte Filter verwenden müssen. Die bakteriologischen Ergebnisse haben infolgedessen keine praktische Bedeutung. Von Interesse sind dagegen die Geschwindigkeitsziffern, die in der nachstehenden Tabelle enthalten sind.

| Datum | Filtrationsgeschwindigkeit sec/l | Filtrationszeit in Stunden | Tagesfiltrat | Gesamtfiltrat | Druck in Atmosph. |
|---|---|---|---|---|---|
| 29. III. 1920 | 14—17 | 3 | 855 | 855 | 2,0—2,75 |
| 30. III. 1920 | 24—27 | 3 | 531 | 1386 | |
| 31. III. 1920 | 39 | 5 | 456 | 1842 | |
| 1. IV. 1920 | 39 | 5 | 402 | 2244 | |
| 2. IV. 1920 | 47 | 1 | 115 | 2359 | |
| 9. IV. 1920 | 82 | 1 | 29 | 2388 | |



Das Filter wurde dann durch bloßes Abwischen mit der Hand gesäubert und rückläufig durchspült. Danach erreichte die Filtergeschwindigkeit wieder *15 sec/l*.

*Die Filtriergeschwindigkeit ist also außerordentlich groß.* Der Geschwindigkeitsrückgang bei Filtration des schwebestoffarmen Göttinger Leitungswassers hält sich in sehr mäßigen Grenzen. Interessant ist die Wiedererreichung der Anfangsgeschwindigkeit nach einfachem Abwischen und rückläufiger Durchspülung des Filters, nachdem dieses 20 Stunden in Betrieb gewesen war und in dieser Zeit rund 2400 Liter Wasser geliefert hatte. Selbstverständlich lassen sich die für das Göttinger Wasser ermittelten Geschwindigkeitsziffern nicht verallgemeinern. Sie werden vielmehr je nach der chemischen Zusammensetzung eines Wassers sowie nach seinem Gehalt an Schwebestoffen erheblichen Schwankungen unterworfen sein.

Erwähnenswert ist noch, daß die Filter nach Abschluß der Filtration mit einer gleichmäßig verteilten braunroten Schlickschicht überzogen waren. Der in Salzsäure aufgelöste Schlick gab deutliche Eisen- und sehr schwache Manganreaktion. Aus der Gesamtschlickschicht des Filters und dem Gesamtwasserfiltrat konnte unter der Voraussetzung, daß alles Eisen auf dem Filter ausgeschieden wurde, als Eisengehalt für 1 Liter Göttinger Leitungswasser die Menge von 0,007 mg errechnet werden, die natürlich nur einen Annäherungswert darstellt.

Mit unseren gewöhnlichen Untersuchungsmethoden haben wir sonst im Göttinger Wasser niemals Eisen, auch kein Mangan nachweisen können.

Mit dem runden Apparat (Abb. 4a) wurde in 2 Versuchen das bakteriologische Verhalten des Massenfiltrates geprüft, und zwar wurde dabei ein 1,6-$\mu$- und ein 0,75-$\mu$-Filter verwendet, d. h. also ein Filter, dessen größte Poren 1,6 $\mu$, eines, dessen größte Poren 0,75 $\mu$ betrugen. Im Filtrat beider Filter waren in den ersten 3 Tagen bei einer Aussaat von 5 ccm keine Keime nachzuweisen. Am 4. Tage waren im Filtrat des 1,6-$\mu$-Filters 7 Keime (kleine graue Kolonien, Stäbchen) nachzuweisen, während das 0,75-$\mu$-Filter weiter steril filtrierte. Am 6. Tage enthielt das 1,6-$\mu$-Filterfiltrat in 5 ccm 17 Keime, das 0,75-$\mu$-Filtrat war keimfrei. Den 1,6-$\mu$-Filterversuch mußte ich aus äußeren Gründen abbrechen, während ich das 0,75-$\mu$-Filter bis zu 10 Tagen beobachten konnte. Das Filtrat blieb keimfrei.

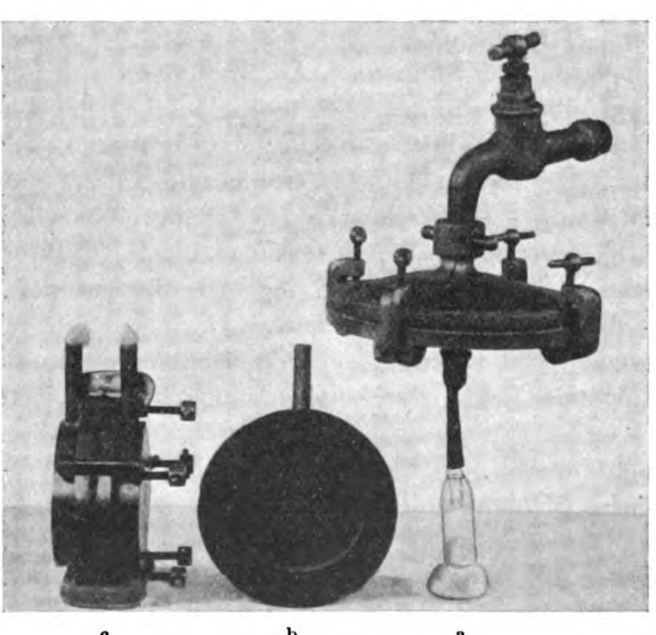
Bei diesen Versuchen wurde also die Beobachtung gemacht, daß ein 1,6-$\mu$-Filter *3 Tage hindurch keimfrei filtrierte, daß dann aber am 4. Tage plötzlich Bakterien im Filtrat erschienen.* Und zwar entsprachen diese Bakterien im Aussehen ihrer Kolonien und in ihrer Morphologie denjenigen, die aus dem unfiltrierten Leitungswasser gezüchtet wurden. Ein Defekt des Filters kam nicht in Frage, wie eine Nachprüfung mit dem





Luftdruckprüfungsapparat ergab. Man konnte an die Möglichkeit denken, daß durch den ständigen Kontakt des Filters mit dem durchfließenden Wasser eventuell eine stärkere Quellung der Filtermasse zustande gekommen war, die irgendwie zu Undichtigkeiten geführt hatte. Nach wiederholten Untersuchungen von Filtern, die mehrere Wochen in Wasser gelegen hatten, mußte ich diese Annahme fallen lassen. Bei einigen Filtern war eine Porenveränderung im Sinne einer Verdichtung um 0,2 $\mu$ zu beobachten, Erweiterung der Filterporen nie. Eine Qualitätsveränderung des Filters kam also für den positiven Bakterienbefund nicht in Frage.

Mit größter Wahrscheinlichkeit konnte man annehmen, ***daß die Bakterien das 1,6-μ-Filter durchwachsen hatten***, ein Vorgang, auf den in der Filterliteratur wiederholt hingewiesen worden ist. Nur so konnte es sich erklären, daß das Filter mehrere Tage hindurch keimfrei filtrierte, dann aber plötzlich die auch im unfiltrierten Wasser nachweisbaren Wasserbakterien passieren ließ. Um zu prüfen, ob die Filter tatsächlich von Bakterien durchwachsen werden, habe ich in dieser Richtung ausgedehnte Versuche angestellt, die auch schließlich zum Ziele geführt haben. Es kam mir bei diesen Versuchen darauf an, jedwedes Moment auszuschalten, welches physikalisch das Hindurchgelangen der Bakterien begünstigen konnte. Die Druckverhältnisse der beimpften und unbeimpften Seite, die chemische Beschaffenheit der Nährlösungen mußte die gleiche sein. Die erstgenannte Vorbedingung war mit Sicherheit zu schaffen. Ich wählte im Laufe der Zeit einen aus zwei Hälften bestehenden Apparat (Abb. 4b u. 4c). Jede Hälfte ist das Spiegelbild der anderen. Jede Hälfte stellt eine rundliche Kammer dar, deren Wand aus Messing besteht und in der Peripherie in einen plangeschliffenen $1^1/_2$ cm breiten Abschlußring übergeht. Jede Kammer ist mit einem kleinen Zuflußrohr versehen.



c b a

Abb. 4.

Die Vorbereitung zum Durchwachsversuch geht nun in der Weise vor sich, daß zunächst die beiden Abschlußringe der Kammer mit einem genau passenden, entsprechend breiten, dicken, weichen Gummi bedeckt werden. Zwischen beide Kammern wird jetzt ein entsprechend zugeschnittenes Filter gelegt und nun der Apparat durch gleichmäßiges Anziehen zirkulär aufgesetzter Schrauben fest zusammengepreßt. Die Rohre werden mit locker aufgesetztem Wattestopf verschlossen und nun zunächst der ganze Apparat im Dampf sterilisiert. Nach der Sterilisation ist es infolge der durch die Erhitzung herbeigeführten Volumveränderung des Metalles nötig, die Schrauben noch mal anzuziehen. Dann wird mittels einer Pipette jede Hälfte mit genau der gleichen Menge Nährflüssigkeit beschickt und der Apparat so aufgestellt, daß die Flüssigkeitsspiegel in beiden Kammern in gleicher Höhe stehen. Man muß dies erreichen, wenn der Apparat auf einer wagerechten Ebene genau senkrecht gestellt wird. In die eine Kammer wird jetzt eine kleine Menge einer dünnen Bakterienaufschwemmung gebracht. Der ganze Apparat wird dann nach Verschluß durch Wattestopfen im Brutschrank bebrütet.

Der Weg von der beimpften zur unbeimpften Kammer geht nur durch das Filter hindurch. Es ergab sich schon in den ersten Versuchen, daß die Bakterien, die im Filtrationsversuch die entsprechenden Filter nicht passiert hatten, im Durchwachsversuch durchschnittlich am 4. oder 5. Tage hindurchgingen. Es war nicht schwer, sie dann in der unbeimpften Kammer nachzuweisen. Erschwert wurden diese Versuche anfangs dadurch, daß kleine Mengen der Metallkammerwand in der Nährflüssigkeit in Lösung gingen, oligodynamisch wirkten und so eine ziemlich hochgradige Wachstumshemmung der Bakterien herbeiführten. Durch Verzinnung der inneren Wände wurde diese Schwierigkeit beseitigt.

Daß die Bakterien auch tatsächlich durch das Filter hindurchgewachsen waren und nicht etwa durch Undichtigkeiten der zirkulären Abdichtung, was an sich ja denkbar gewesen wäre, ihren Weg genommen hatten, dafür lieferten den sinnfälligen Beweis mehrere Feinschnitte durchwachsener Filter, in deren Maschen im Flach- und Querschnitt an vereinzelten Stellen zahlreiche mit Fuchsin gefärbte Mikroorganismen teils durch die ganze Dicke des Filters hindurch, teils nur oberflächlich eingedrungen, verfolgt werden konnten.

Für Coli lag die Durchwachsgrenze bei etwa 1,2 $\mu$, also etwa 0,5 $\mu$ tiefer als im Filtrationsversuch. Gleiche Werte ergaben sich für Typhus und Ruhr. Auch die mit Choleravibrionen angesetzten 0,75-$\mu$-Filter wurden nicht durchwachsen. Als Nährflüssigkeit diente

mir für diese Versuche Bouillon resp. Peptonlösung. Als ich steriles Wasser verwendete und die Apparate bei Zimmertemperatur stehen ließ, erfolgte auch bei Verwendung eines 1,7-$\mu$-Filters kein Durchwachsen von seiten der Coligruppe. Noch nach 10 Tagen war die unbeimpfte Seite steril, während die beimpfte Coliwachstum zeigte. Das gleiche Verhalten zeigten die zur Coligruppe gehörenden pathogenen Keime. Es dürfte daraus hervorgehen, daß Verwendung von Nährlösungen als Substrat das Durchwachsenwerden der Filter wesentlich begünstigt, und daß man die Tatsache *des Durchwachsenwerdens der Filter bei Aufschwemmung der Bakterien in Bouillon nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse bei der Wasserfiltration übertragen darf.*

Daß die Bakterien beim Durchwachsversuch das Filter passieren, während sie im Filtrationsversuch vom gleichen Filter zurückgehalten werden, muß man sich wohl so erklären, daß für das in der Richtung des Porenkanals wachsende Bacterium die Verhältnisse zum Hindurchgelangen irgendwie günstiger liegen. Es wäre denkbar, daß die Abknickung der Filterporengänge, wie sie ja fraglos vorhanden sein werden, einem gewissermaßen der Wand entlang wachsenden Bacterium nicht den Widerstand entgegensetzen werden, wie einem Bacterium, welches unter Druck filtriert wird. Dieses letztere wird mit der Nährflüssigkeit in das Filter hineingerissen, an Porenverzweigungen wird ein solches Bacterium unter Umständen sich in seinem größten Durchmesser, also in der Längsrichtung quer vor einen Porengang legen können, den er sonst vielleicht passiert haben würde. Auch wird der Umstand nicht ganz ohne Bedeutung sein, daß während der Filtration die Schicht von Bakterien, die sich vor dem Siebfilter anstaut, andere Bakterien adsorbiert oder abfiltriert. Ich glaube aber, daß in erster Linie die gewissermaßen physiologische, im Wachstum begründete, immer dem vorgeschriebenen Wege der durchlässigen Pore folgende Fortbewegung des Bacteriums, wie sie im Durchwachsversuch vor sich geht, für die Unterschiede im Effekt der Filtration und in dem des Durchwachsversuches verantwortlich zu machen ist. Eine Unterstützung dieses Durchwachsmechanismus wird vielleicht noch herbeigeführt durch positive Chemotaxis. Durch die Anreicherung der bakteriellen Stoffwechselprodukte in der beimpften Kammer verschlechtert sich der Nährboden hier erheblich, und ich könnte mir vorstellen, daß infolge der zunehmenden Verschiedenartigkeit im chemischen Verhalten der beiden Kammerhälften, Diffusionsströme entstehen, die in einer dem Filter anliegenden dünnen Flüssigkeitsschicht der beimpften Kammer, sowie im Filter selbst günstigere Lebensverhältnisse für die Bakterien schaffen und so im Sinne der positiven Chemotaxis eine unverhältnismäßig große Zahl von Bakterien in die unmittelbare Nähe des Filters bringen. Ist das Bacterium einmal in die günstigen



Nährbodenverhältnisse der Filterpore gelangt, erfolgt die Teilung in der Richtung zum besseren Nährboden.

Die Frage, wieweit die *Möglichkeit des Durchwachsenwerdens* auf die Brauchbarkeit der Filter von Einfluß ist, hängt im wesentlichen ab von der für die *Filtration nötigen Zeitdauer*. Bei Laboratoriumsversuchen wird man deshalb die Porenweite nur dann so eng zu wählen brauchen, daß ein Durchwachsen ausgeschlossen ist, wenn der Versuch außergewöhnlich lange Zeit in Anspruch nimmt. Im übrigen wird man mit der zur Zurückhaltung der Bakterien nötigen Porenweite auskommen können. Etwas anders liegen die Dinge bei der *Filtration* von *Trinkwasser*. Man muß hier, da das Filter dauernd mit dem Wasser in Berührung bleibt, oberhalb einer gewissen Porengröße mit der Möglichkeit rechnen, daß die Filter von Wasserbakterien durchwachsen werden. Mit dem Durchwachsen *pathogener Bakterien* wird man aber nur dann zu rechnen haben, wenn ausnahmsweise einmal die Bedingungen so liegen sollten, daß ihnen Wachstumsmöglichkeit im Wasser geboten ist. Ob das unter praktischen Verhältnissen jemals vorkommt, ist sehr fraglich, ist doch auch unter den *zahlreichen, mit früheren Bakterienfiltern angestellten Versuchen kein einziger, bei dem das Durchwachsen von pathogenen Keimen im Wasser erwiesen wäre.*

Will man absolut sicher gehen, so muß man Filter unter 0,75 $\mu$ Porenweite verwenden. Dann scheint nach meinen Versuchen jedes Durchwachsen ausgeschlossen zu sein. Diese Filter haben sich in mehreren Durchwachsversuchen, die zum Teil über 3 Wochen ausgedehnt wurden, als absolut dicht erwiesen. Sie wurden weder von Coli, Ruhr, Typhus, Cholera, noch Spirillum parvum durchwachsen.

## *Zusammenfassung.*

1. Die *Zsigmondy-Bachmann*-Filter filtrieren bei geeigneter Auswahl sicher keimfrei und mit großer Geschwindigkeit. Die leichte Entfernbarkeit des Rückstandes macht sie zur Gewinnung der Bakterien aus Flüssigkeiten, insbesondere aus Urin und Wasser, geeignet. Wegen ihrer geringen Adsorptionsfähigkeit können sie mit Vorteil für die Filtration kolloidhaltiger Flüssigkeiten benutzt werden.

2. Die maximale Porenweite, d. i. die Weite der größten Poren eines Filters ist durch das zum ersten Male von *Bechhold* für Filterprüfungen verwandte Luftdruckprüfungsverfahren bestimmbar. Jede Pore, die die für die Bakterienfiltration zulässige Porenweite überschreitet, ist mittels dieses Verfahrens genau zu lokalisieren; so kann man aus großen Filtern, die Fehler enthalten, geeignetes dichtes Filtermaterial ausschneiden und dieses in kleineren Apparaten verwenden.

3. Die für die Filtration der verschiedenen geprüften Bakterienarten zulässigen maximalen Porenweiten liegen zwischen 0,75 und 2,3 $\mu$. Zur



Verhinderung des Durchwachsens müssen die Poren für dasselbe Bacterium etwas enger sein als zur Zurückhaltung bei der Filtration.

4. Wegen ihrer großen Filtrationsgeschwindigkeit eignen sich die Filter auch gut zur Gewinnung von keimfreiem Trinkwasser. Die Abnahme der Filtrationsgeschwindigkeit bei längerer Benutzung war bei Verwendung von Göttinger Leitungswasser gering, doch ist es möglich, daß andere Wässer sich anders verhalten.

5. Bei längerer Dauer der Filtration werden die Filter von Wasserbakterien durchwachsen. Man kann aber durch Verwendung sehr engporiger Filter (höchstens 0,75 $\mu$) das Durchwachsen verhüten.

(Aus der Medizinischen Universitätsklinik Breslau [Direktor: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. *Minkowski*].)

# III. Über den Mechanismus des Trypanocidieschwundes bei Leberkranken*).

Von
**F. Rosenthal** und **R. Freund.**

## I.

In den vorangehenden Mitteilungen[16]) haben wir, angeregt durch eine kurze Notiz von *Paul Ehrlich* und *Wechsberg*, gemeinsam mit *L. Platau*, *M. Krüger* und *H. Nossen* an einem großen klinischen Material die nahen Zusammenhänge zwischen Leberkrankheiten und dem verminderten Gehalt des menschlichen Serums an trypanociden Substanzen eingehend dargelegt und begründet. Eine systematische Untersuchung der verschiedenartigsten Krankheitszustände ergab, daß der trypanocide Titer des menschlichen Serums selbst terminal bei schweren konsumierenden Krankheiten innerhalb normaler Grenzen gewahrt bleibt, und daß nur bei den mit Gallenstauung bzw. mit cholämischer Blutzusammensetzung einhergehenden ausgeprägten Ikterusformen und bei schwersten diffusen Erkrankungen des Leberparenchyms auch ohne begleitenden Ikterus die Trypanocidie des menschlichen Serums einen deutlichen, oft hochgradigen Absturz erfährt. In manchen Fällen von schwerem Stauungsikterus und im Stadium des mit und ohne Ikterus verlaufenden hepatargischen Symptomenkomplexes kann man sogar, wie die angeführten Protokolle zeigten, fast von einem Schwunde der trypanociden Serumkörper sprechen.

Inzwischen sind diese Untersuchungen von *Zeiß* im Hamburger Institut für Schiffs- und Tropenhygiene aufgenommen worden, der zu den gleichen Ergebnissen wie wir gelangte und gleichfalls das Absinken des trypanociden Titers bei Ikterischen auf eine gestörte Leberfunktion zurückführt. Er konnte den Absturz der Trypanocidie im ikterischen Serum nicht nur wie wir bei Infektionen mit Trypanosoma *Brucei* (Nagana), sondern auch gegenüber Trypanosoma equinum, equiperdum, rhodensiense und Schizotrypanum cruzi nachweisen. Weiter hat *Leichtentritt*, anknüpfend an unsere mit *Kleemann* gemeinsam erhobenen Feststellungen über den Mangel des Neugeborenenserums an trypanociden Substanzen Versuche über die Schwankungen

---

*) Die Arbeit ist mit Mitteln der *Robert Imbach*-Spende ausgeführt worden.





des trypanociden Titers bei skorbutkranken Kindern angestellt. Wir halten solche systematischen Untersuchungen an kranken Säuglingen für besonders aussichtsreich, da hier angesichts des hier anzunehmenden physiologischen Unreifezustandes der Leber (vgl. *Rosenthal* und *Krüger*) Störungen der Leberfunktion sich möglicherweise viel stärker auf das Blut projizieren können als beim Erwachsenen.

Die Tatsache, daß das Schwinden der trypanociden Substanz aus dem Serum nicht an eine Überladung des Blutes mit Gallenbestandteilen notwendigerweise gebunden ist, sondern beim Erwachsenen auch als Begleiterscheinung schwerster diffuser Lebererkrankungen ohne Ikterus auftritt, ist für das Verständnis dieses Vorganges naturgemäß von erheblicher Bedeutung. Man darf hieraus folgern, daß die Anwesenheit der Gallenbestandteile im Blut nicht den ausschlaggebenden Faktor für die Genese des Trypanocidieschwundes bei den cholämischen Ikterusformen darstellt, und daß angesichts der engen elektiven Beziehungen zu ikterischen und nichtikterischen schweren Lebererkrankungen dem Absturz des trypanociden Titers ein einheitlicher Entstehungsmechanismus zugrunde liegen dürfte. So legen die geschilderten Zusammenhänge zwischen Leberkrankheiten und dem verminderten Gehalt des menschlichen Serums an trypanociden Substanzen den berechtigten Schluß nahe, daß der trypanocide Titer des menschlichen Serums in engem Abhängigkeitsverhältnis zur Funktionstüchtigkeit der Leber steht, und daß aller Wahrscheinlichkeit nach *die Leber sogar die Hauptbildungsstätte der trypanociden Serumkörper ist.*

Die Richtigkeit dieser Schlußfolgerung hat sich bei der experimentellen Beantwortung weiterer Fragestellungen zu erweisen, die sich mit der eingehenden Analyse des Phänomens des Trypanocidieschwundes von selbst ergeben. Die Möglichkeit einer einheitlichen Betrachtungsweise des Mechanismus der Reaktion bei ikterischen und nichtikterischen Leberprozessen hat zur Voraussetzung, daß die charakteristischen Veränderungen des Blutchemismus, wie sie sich mit dem Eindringen der Gallenbestandteile ins Blut ergeben, ohne Einfluß auf die trypanocide Kraft des Menschenserums bleiben, daß mit anderen Worten den in den Kreislauf übertretenden Gallenbestandteilen bei cholämischen Ikterusformen keine zerstörenden Wirkungen auf die trypanociden Serumsubstanzen zukommen. In ausgedehnten Untersuchungen, über die wir bereits berichtet haben, sind wir mit *Krüger* dieser Frage schon nähergetreten. Wir konnten zeigen, daß zwar in großen Mengen menschliche Galle die trypanociden Eigenschaften des Menschenserums im Reagensglase zu zerstören vermag, daß aber in den Konzentrationen, die selbst maximalen, im ikterischen Serum verwirklichten Werten entsprechen dürften, weder Galle noch Gallenbestandteile, insbesondere die gallensauren Salze die trypanocide Substanz des mensch-



lichen Serums in nennenswertem Maße beeinträchtigen. Es sprechen diese Befunde dafür, daß der Absturz des trypanociden Titers im ikterischen Serum nicht auf einen Zerstörungsprozeß durch Gallenbestandteile zurückzuführen ist, sondern daß hier mit Störungen der Bildung in den Produktionsstätten der trypanociden Serumkörper primär zu rechnen ist.

Die Einwände, die sich gegen unsere Reagensglasversuche erheben lassen, haben wir bereits selbst in unserer früheren Mitteilung diskutiert. Es bleibt aber immerhin bei strenger Kritik der Einwand gegen die Methode bestehen, daß die mit künstlichen Gemischen erhobenen Befunde nicht ohne weiteres mit dem Blutchemismus bei cholämischen Menschen in Parallele gesetzt werden können und daß erst das komplizierte Zusammenspiel aller sich im ikterischen Blut vollziehenden primären und sekundären Veränderungen die Aufhebung des trypanociden Serumeffektes im Gefolge habe. Insbesondere bleibt auch bei diesen Reagensglasversuchen die Frage ganz unbeantwortet, ob nicht im Blute von Ikteruskranken Stoffe, vielleicht sekundäre Stoffwechselprodukte kreisen, die, ohne also selbst Gallenbestandteile zu sein, doch eine trypanocide Wirkung im ikterischen Menschenserum verhindern können.

Die letztere Frage ist auch von *Zeiß* schon in Angriff genommen worden. Da unsere Befunde sich mit den seinigen vollkommen decken, können wir uns kurz fassen und über unsere eigenen Befunde summarisch berichten. Auch wir haben im Mischungsversuch den Einfluß von größeren Mengen von wirkungslosem ikterischen Menschenserum auf gerade noch wirksame Normalserumdosen untersucht. Sollte das Phänomen des Trypanocidieschwundes auf der Anwesenheit zerstörender Serumsubstanzen beruhen, so war im Falle des Überschusses solcher Stoffe mit der Möglichkeit zu rechnen, daß auch das normale Menschenserum nach Digerierung mit dem ikterischen Serum eine Einbuße seiner trypanociden Kraft erleiden könnte.

*Tabelle I.*

Enthält wirkungsloses ikterisches Serum (kompletter Choledochus-Verschluß durch Tumor-Metastasen bei primärem Magencarcinom) im Überschuß Substanzen, die im Mischungsversuch die trypanocide Wirkung des normalen Menschenserums aufheben? Serum subcutan, Nagana intraperitoneal.

| Tage nach der Infektion | 0,8 ccm ikterisches Serum + 0,2 ccm Normalserum pro 20 g Maus | | 0,8 ccm ikterisches Serum pro 20 g Maus | 0,2 ccm Normalserum pro 20 g Maus | Infektionskontrolle |
|---|---|---|---|---|---|
| | Fr. 102 | Fr. 103 | Fr. 106 | Fr. 104 | Fr. 105 |
| 1 | 0 | 0 | ++ | 0 | ++ |
| 2 | 0 | 0 | +++ | 0 | +++ |
| 3 | 0 | 0 | † | 0 | † |
| 4 | 0 | 0 | | 0 | |
| 5 | 0 | 0 | | 0 | |

Wie aus dem Reihenversuch der Tabelle I hervorgeht, vermag das an sich unwirksame ikterische Serum (vgl. Fr. 106) keinen abschwächenden Einfluß auf das trypanocide normale Menschenserum auszuüben. Auch nach Mischung mit ikterischem Serum bewahrt das Normalserum anscheinend ungemindert seine therapeutischen Eigenschaften. So sind am 5. Tage nach der Infektion die mit dem im Protokoll angegebenen Serumgemisch behandelten Mäuse Fr. 102 und 103 genau so wie die mit 0,2 ccm Normalserum allein gespritzte Maus Fr. 104 frei von Trypanosomen in der Zirkulation, während die Infektionskontrolle Fr. 105 bereits 2 Tage vorher an der Infektion zugrunde gegangen ist. Es lassen sich somit auch im schwer ikterischen Serum auf diesem Wege keine die trypanocide Serumsubstanz zerstörenden Stoffe nachweisen.

Auch diesen Befunden, die gleichfalls viel mehr auf eine *Störung der Bildung* als auf eine Zerstörung der trypanociden Substanz im peripheren Blut beim Ikterus hindeuten, wird man eine eindeutige Beweiskraft für die Art des Mechanismus beim Trypanocidieschwund nicht ohne weiteres zuerkennen dürfen. Es bleibt bei ihnen die Möglichkeit offen, daß die hypothetischen zerstörenden Stoffe nicht im Überschuß im ikterischen Serum vorhanden zu sein brauchen, bzw. mit dem Zerstörungsprozeß selbst unwirksam werden, so daß sie im Mischungsversuch mit normalem Menschenserum nicht zur Verfügung stehen.

Wirklich entscheidende und zu endgültigen Schlußfolgerungen berechtigende experimentelle Verhältnisse bieten sich erst dar, wenn man den bei den cholämischen Ikterusformen bestehenden Blutchemismus im Experiment nachahmt und in diesem Medium die trypanocide Substanz des normalen menschlichen Serums zur Wirkung gelangen läßt. Der Weg hierzu ist gegeben, wenn man den serotherapeutischen Versuch statt in die gesunde Maus in das *schwer ikterische Tier* verlegt. Wir gingen hierbei von folgenden Erwägungen aus: Ist für das Phänomen des Trypanocidieschwundes bei den cholämischen Ikterusformen eine direkt zerstörende Wirkung der Gallenbestandteile, insbesondere der Gallensäuren, verantwortlich zu machen oder spielt hier ein anderes, im ikterischen Blut kreisendes Stoffwechselprodukt eine ausschlaggebende Rolle, so muß dieser Zerstörungsprozeß auch in die Erscheinung treten, wenn man den therapeutischen Versuch mit normalem Menschenserum in der schwer ikterischen Maus ablaufen läßt. Im Falle einer direkt schädigenden Wirkung der Gallenbestandteile oder eines anderen Körpers des ikterischen Blutes auf die trypanocide Serumsubstanz war mit einem Versagen der Heilwirkung des Menschenserums in der ikterischen Maus zu rechnen, andernfalls war mit dem prompten Eintritt der trypanociden Serumwirkung auch im cholämischen Mauskörper ein nunmehr exakter Beweis für die Indifferenz der Gallenbestandteile und anderer hypothetischer Körper des ikte-





rischen Blutes beim Entstehungsmechanismus des Trypanocidieschwundes erbracht.

Unsere Technik war folgende: Zur Auslösung eines schweren Ikterus bei der Maus haben wir eine größere Reihe von Tieren nach dem Vorgange von *Goldmann* mit dem von *Ehrlich* und *Schmitz* hergestellten Ikterogen, einer Dimethylpyrrolphenylarsinsäure, vergiftet*). Als Vergiftungsdosen verwendeten wir 1 ccm einer Verdünnung 1 : 5000 subcutan. Bei den meisten Tieren entwickelt sich dann im Verlaufe von 8—10 Tagen ein mehr oder minder starker Ikterus, der sich in einer starken Gelbfärbung der Ohren und der unbehaarten Teile der Extremitäten dokumentiert. Bei einem kleineren Teil der so vergifteten Tiere haben wir durchschnittlich nach 1 Woche die gleiche Dosis von neuem injiziert, da der Ikterogen-Ikterus nur schwach in die Erscheinung trat. Auf diese Weise hatten wir nach Ablauf von 14 Tagen eine größere Reihe von schwer ikterischen Mäusen zur Verfügung, an denen wir dann unsere Serienversuche angestellt haben. Bei einem Teil der mit Ikterogen behandelten Mäuse klang der Ikterus im Verlaufe von ca. 4 Wochen allmählich ab, manche Tiere gingen im Stadium des schwer ausgeprägten Ikterus nach verschieden langen Zeiten zugrunde. An solchen schwer ikterischen Mäusen haben wir den Einfluß des menschlichen Normalserums auf den Verlauf der experimentellen Trypanosomeninfektionen geprüft. Der Ikterogen-Ikterus der Maus zeigt, worauf auch schon die histologischen Leberbefunde *Goldmanns* hinweisen, die klinischen Erscheinungen der cholämischen Ikterusformen. Die direkte Diazoreaktion im Serum nach *Hijmans van den Bergh* ist prompt positiv, im Urin ist reichlich Gallenfarbstoff nachweisbar. Im Stadium des ausgeprägten Ikterus betrug der Gallenfarbstoffgehalt des Serums zwischen 8—10 Bilirubineinheiten.

*Die Intensität des Ikterogen-Ikterus unserer Versuchsmäuse entsprach somit dem eines stark entwickelten menschlichen Ikterus vom cholämischen Typus.* Wir führen folgendes Versuchsbeispiel Tabelle II an:

*Tabelle II.*

Bewahrt in stark ikterischen Mäusen normales Menschenserum seine trypanocide Wirkung?

Serum subcutan, Nagana intraperitoneal.

| Tage nach der Infektion | Stark ikterische Mäuse pro 20 g | | | | Normale Mäuse pro 20 g | | | | Stark ikter. Maus z. Kontr. einer prophylakt. Wirkung d. Ikterogens und des Ikterus | Infektionskontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,5 ccm | 0,4 ccm | 0,3 ccm | 0,2 ccm | 0,5 ccm | 0,4 ccm | 0,3 ccm | 0,2 ccm | | |
| | Fr. 72 | Fr. 73 | Fr. 74 | Fr. 75 | Fr. 77 | Fr. 78 | Fr. 79 | Fr. 80 | Fr. 76 | Fr. 81 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | (+) | (+)—+ |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | +++ | +++ |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | † | † |
| 4 | †0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 5 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |
| 7 | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | |

Fr. 72—75 gibt den Ablauf des serotherapeutischen Versuches mit absteigenden Serummengen von 0,5 bis 0,2 ccm pro 20 g Maus in schwer ikterischen Tieren wieder. Fr. 77—80 zeigt den trypanociden Effekt

*) Wir sind den Höchster Farbwerken für die Überlassung des Präparates zu großem Danke verpflichtet.



des gleichen Menschenserums bei normalen, nichtikterischen Tieren. Fr. 76 beweist, daß weder der starke Ikterus noch die zurückliegende Ikterogenvorbehandlung die Entwicklung der Trypanosomeninfektion beeinflußt. Dementsprechend läuft die Trypanosomeninfektion bei Fr. 76 in gleicher Weise wie bei dem unbehandelten Kontrolltiere Fr. 81 ab. Das Ergebnis der Versuche Fr. 72—80 kann somit als reiner Ausdruck einer ausschließlichen Serumwirkung gedeutet werden.

Es geht nun aus dem Verlaufe dieses Reihenversuches eindeutig hervor, daß *auch im schwer ikterischen Mauskörper die trypanocide Wirkung des Menschenserums ungemindert wie bei normalen Mäusen gewahrt bleibt*. Selbst bei den geringen Serumdosen von 0,2 ccm pro 20 g Maus (vgl. Fr. 75 und Fr. 80) macht sich kein abschwächender Einfluß der im Blute kreisenden Gallenbestandteile auf die Trypanocidie des injizierten normalen Serums bemerkbar. Die mit aktivem Mäuseserum behandelten ikterischen Mäuse (Fr. 73—75) sind genau so wie die entsprechenden Normaltiere (Fr. 77—80) auch am 7. Versuchstage noch frei von Parasiten, während die Kontrolltiere Fr. 76 und Fr. 81 bereits am 3. Tage nach der intraperitonealen Infektion der Trypanosomensepticämie erlegen sind. Nur Maus Fr. 72 stirbt interkurrent am 4. Tage post infectionem trypanosomenfrei, wohl an den Folgen der Ikterogenvergiftung.

Nach diesen Feststellungen, die durch unsere geschilderten Reagensglasversuche in entsprechender Weise ergänzt wurden, halten wir uns nunmehr zu dem beweiskräftigen Schluß berechtigt, daß *bei dem Entstehungsmechanismus des Trypanocidieschwundes weder zerstörende Eigenschaften der Gallenbestandteile noch irgendeines anderen hypothetischen Hemmungskörpers eine ursächliche Rolle spielen*. Auch im cholämischen Medium der schwer ikterischen Maus erfährt trotz des tagelangen Kontaktes der trypanociden Serumsubstanz mit allen für eine direkte Zerstörung in Frage kommenden Stoffen das menschliche Normalserum keine Einbuße seiner therapeutischen Kraft. Damit gelangen wir auch über den Weg des Experimentes zu einer einheitlichen Betrachtungsweise der Reaktion des Trypanocidieschwundes. Das Phänomen des Absturzes des trypanociden Serumtiters bei cholämischen Ikterusformen und hepatargischen auch ohne Ikterus verlaufenden Krankheitszuständen ist nicht ein „Plusphänomen", das sich aus dem Auftreten von neuen, die Serumtrypanocidie beeinträchtigenden Körpern erklärt, sondern ein „Minusphänomen", das auf einer *Störung des Bildungsprozesses der trypanociden Serumsubstanzen* beruht, den wir angesichts der engen Verkettung zwischen Trypanocidieschwund und Lebererkrankungen im wesentlichen in die Leber verlegen dürfen.

Damit sind wir, wie wir es auch früher angenommen hatten, in der Tat zu der Kenntnis einer *neuen physiologischen Funktion der*



*Leber* gelangt. Wir müssen uns angesichts der geschilderten Befunde vorstellen, daß sowohl bei den cholämischen Ikterusformen wie bei den nichtikterischen schweren diffusen Leberprozessen, insbesondere den von hepatargischen Symptomen begleiteten Parenchymerkrankungen eine spezifische Leberfunktion erlischt, welcher bei einer nicht beeinträchtigten Tätigkeit des Organes normalerweise die Aufgabe zufällt, das Niveau des trypanociden Serumtiters innerhalb der empirischen Grenzen aufrechtzuerhalten. Welche Aufgabe der trypanociden Serumsubstanz im Rahmen des normalen Stoffwechsels zukommt, bleibt hierbei zunächst völlig unbekannt.

## II.

Gegen unsere Anschauung, daß in der Reaktion des Trypanocidieschwundes sich das Erlöschen einer spezifischen, bisher unbekannten Partialfunktion der Leber kundgibt, sind vor kurzem von *Lange* Einwände erhoben worden, die sich durch die geschilderten Untersuchungen größtenteils von selbst erledigen, die aber doch einer Stellungnahme bedürfen, da mit ihnen zugleich der Versuch gemacht wird, die Reaktion des Trypanocidieschwundes auf bekannte, nur bisher mit anderen Methoden erfaßte Immunitätsvorgänge zurückzuführen. Damit berühren sie Fragestellungen, die seit längerer Zeit schon Gegenstand unserer experimentellen Untersuchungen gewesen sind und über die wir gleichfalls Abschließendes zu berichten jetzt in der Lage sind.

*Lange* sieht in der Reaktion des Trypanocidieschwundes bei den schweren diffusen Lebererkrankungen des Menschen nichts anderes als den Ausdruck eines Komplementschwundes, der im Trypanosomenexperiment „auf einem sehr komplizierten und überflüssigen Umwege“ bestimmt werde. Er sieht die Berechtigung seiner Deutungen durch folgende Momente gegeben:

1. Bei Leberkranken soll quantitativ proportional dem Gehalt an Gallensäuren im Blut der Komplementgehalt des menschlichen Serums abnehmen*).

2. Die trypanocide Substanz des menschlichen Serums sei ein komplexer Körper, der, um wirksam in die Erscheinung zu treten, der Aktivierung durch das Komplement bedarf. Das menschliche Serum büßt daher entsprechend der Komplementzerstörung durch die im Blute sich anhäufenden Gallensäuren seine trypanociden Funktionen ein.

3. Der Mausorganismus ist nicht imstande, einen menschlichen Amboceptor zu komplettieren; das ikterische Serum mit seiner Kom-

*) Diese These stützt sich offenbar auf die mißverstandene Angabe *Ehrlichs* und *Morgenroths*, wonach bei phosphorvergifteten, meist nicht ikterischen Kaninchen im Endstadium ein Komplementschwund auftritt. (Berl. klin. Wochenschr. 1900, S. 683.)



plementverarmung wird somit im Mauskörper nicht reaktiviert und kann daher keine therapeutischen Wirkungen mehr auf die experimentelle Trypanosominfektion der Maus enthalten. —

Jede dieser Thesen ist völlig hypothetisch, keine dieser Hypothesen ist richtig.

Ad 1. Über einen strengen Parallelismus resp. über die Beziehungen zwischen Gallensäuren im Blut und Komplementgehalt läßt sich schon aus dem einfachen Grunde nichts aussagen, weil wir bisher über keine quantitative Bestimmungsmethode der Gallensäuren verfügen, die selbstverständlich überhaupt Voraussetzung für den Nachweis einer solchen engen Proportion wäre. Es kann daher auch gar keine Rede davon sein, daß die Titrierung des Komplementes im frischen Serum als Methode des quantitativen Gallensäurenachweises im Blute dienen kann, ganz abgesehen davon, daß der Komplementgehalt von einer Reihe auch anderer Faktoren (vgl. *Moro* und *Lüdke* und viele andere, vgl. besonders *Sachs*) selbstverständlich beeinflußt werden kann. Wenn *Lange* sich auf Reagensglasversuche stützt, in denen sich beim künstlichen Zusatz von Gallensäuren zum Serum „proportional“ ein Absinken des Komplementgehaltes bemerkbar machte — Versuche, die auf längst bekannte Beobachtungen von *Sachs* und *Altmann*, *Neufeld* und *Händel*, *Levaditi* und *Yamanouchi* zurückgehen —, so hört seine Beweisführung gerade an der Stelle auf, wo sie gerade erst zu beginnen hätte, nämlich bei der Frage, ob die Reagensglasphänomene wirklich eine möglichst genaue Nachahmung der im ikterischen Organismus verwirklichten Konzentrationen bedeuten, also überhaupt auf die für den Blutchemismus des cholämischen Ikterus geltenden Verhältnisse übertragen werden können. Sicherlich trifft dies nicht auf das von *Lange* angeführte Beispiel des Gallenzusatzes zu Blutkulturen zu. Hier handelt es sich um Beimengung so großer Gallenmengen, daß es nicht nur zur Zerstörung des Komplementes, sondern auch zu einer Hämolyse der Erythrocyten kommt, wie sie selbst bei schwersten chronischen Ikterusformen niemals in die Erscheinung tritt. Ähnliches gilt auch, wie wir bereits vor *Lange* ausdrücklich betont haben (vgl. *Rosenthal* und *Krüger*), für die zerstörende Wirkung der Galle und Gallensäuren gegenüber der trypanociden Serumsubstanz. Sie wird erst in vitro bei Konzentrationen vernichtet, wie sie auch beim schwer ikterischen Menschen nicht oder kaum anzutreffen sein dürften (*Morawitz* und *Bierich*).

Wie wenig im übrigen die Angabe *Langes* zutrifft, daß die Reaktion des Trypanocidieschwundes auf einem Komplementschwunde beruhe und daß bei Schwerikterischen „quantitativ proportional dem Gehalt an Gallensäuren“ eine Abnahme des Komplementgehaltes stattfinde, mögen die beiden folgenden Beispiele der Tabellen III und IV beleuchten.



*Tabelle III.*

**Trypanocidieschwund bei reichlichem Komplementgehalt des ikterischen Serums. Bei 10 lös. Dos. eines Hammelblut-Kaninchenimmunserums Komplementtiter des normalen Serums: 0,2 ccm, des ikterischen Serums: 0,08 ccm. — Serum subcutan, Nagana intraperitoneal.**

| Tage nach der Infektion | Ikterisches Serum pro 20 g Maus | | | Normalserum pro 20 g Maus | | Infektionskontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,5 ccm | | 0,8 ccm | 0,5 ccm | 0,8 ccm | |
| | Fr. 48 | Fr. 49 | Fr. 50 | Fr. 53 | Fr. 54 | Fr. 52 |
| 1 | (+) | (+) | ++ | 0 | 0 | + |
| 2 | ++ | + | +++ | — | 0 | +++ |
| 3 | +++ | +++ | † | 0 | 0 | † |
| 4 | † | † | | 0 | 0 | |
| 5 | Im ikterischen Serum bei indirekter | | | 0 | 0 | |
| 7 | Diazoreaktion: 10 B.E. | | | 0 | 0 | |

Das hier verwendete Serum entstammt einem Falle von schwerem sog. katarrhalischen Ikterus mit prompter Diazoreaktion und 10 Bilirubineinheiten im Serum nach *Hijmans van den Bergh*. Die Reaktion des Trypanocidieschwundes tritt in der üblichen Weise auch hier in ausgeprägter Weise in die Erscheinung: die mit 0,5 ccm bzw. 0,3 ccm Serum pro 20 g Maus behandelten Tiere Fr. 48—50 gehen an der Trypanosomeninfektion zugrunde, bei Fr. 48 und 49 erleidet der Ablauf der Infektion eine geringfügige Verzögerung als Zeichen, daß offenbar noch Spuren der trypanociden Substanz im Serum vorhanden sind. Demgegenüber entfalten die gleichen Mengen von normalem menschlichen Serum bei den Mäusen Fr. 53 und 54 die bekannte trypanocide therapeutische Wirkung: Beide Tiere sind auch am 7. Tage nach der Infektion frei von Parasiten in der Zirkulation. Trotz dieses Absturzes des trypanociden Titers im ikterischen Serum zeigt das ikterische Serum bei der Komplementtitration im hämolytischen System mit Hammelblut-Kaninchenimmunserum und 5 proz. Hammelblutaufschwemmung sogar einen höheren Komplementgehalt als das normale menschliche Serum. Beide Sera kamen etwa 2 Stunden nach Gewinnung bereits zur Komplementtitration. Von irgendeinem Parallelismus zwischen der Reaktion des Trypanocidieschwundes und einer Komplementverarmung des Serums kann somit entgegen den Behauptungen von *Lange* gar keine Rede sein, ebenso trifft die Angabe *Langes* von einer konstanten, auf die Gallensäuren zurückzuführenden proportional zunehmenden Komplementverarmung des ikterischen Blutes sicherlich nicht zu.

Wir sind in der Lage, einen völlig entsprechenden Fall von schwerem mechanischen Ikterus infolge kompletten Tumorverschlusses des Ductus choledochus hier anfügen zu können, bei dem sich gleichfalls eine ausgesprochene Dissonanz zwischen der Reaktion des Trypanocidie-





schwundes und dem Komplementgehalte des ikterischen Serums feststellen ließ, wie dies aus den Protokollen der folgenden Tabelle IV ersichtlich ist.

*Tabelle IV.*

Trypanocidie-Schwund bei reichlichem Komplementgehalt des ikterischen Serums. Im ikterischen Serum: 12 B. E. bei indirekter Diazo-Reaktion. — Serum subcutan, Nagana intraperitoneal.

| Tage nach der Infektion | Ikterisches Serum pro 20 g Maus | | | Normalser. p. 20 g Maus | | Infektions-kontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,4 ccm | 0,8 ccm | 0,2 ccm | 0,8 ccm | 0,2 ccm | |
| | Fr. 89 | Fr. 90 | Fr. 91 | Fr. 87 | Fr. 88 | Fr. 92 |
| 1 | (+) | + | + | 0 | 0 | (+) |
| 2 | + + | + + + | + + | 0 | 0 | + + |
| 3 | + + + | † | + + + | 0 | 0 | + + + |
| 4 | † | | † | 0 | 0 | † |
| 5 | | | | 0 | 0 | |
| 7 | | | | 0 | 0 | |

Komplementtiter bei 10 l D. eines Hammelblut-Kaninchen-Amboceptors } des: Normalserums: 0,1 ccm; Ikterusserums: 0,06 ccm

Auch hier überragt der Komplementgehalt des ikterischen Serums, das bei den Mäusen Fr. 89—91 den tödlichen Ablauf der Trypanosominfektion in den angewandten Mengen von 0,4 bis 0,2 ccm pro 20 g Maus nicht aufzuhalten vermag, beträchtlich den Komplementtiter des normalen menschlichen Serums, das trotz seiner geringeren Komplementmengen in den Mäusen Fr. 87 und 88 bei Verwendung der gleichen Serumdosen einen markanten therapeutischen Effekt erzielt: die mit dem hier komplementärmeren Normalserum behandelten Mäuse sind noch am 7. Tage post infectionem trypanosomenfrei, während die mit hier komplementreicherem ikterischen Serum behandelten Tiere zugleich mit der unbehandelten Infektionskontrolle Fr. 92 spätestens am 4. Tage an der Trypanosomensepticämie eingegangen sind.

*Die Reaktion des Trypanocidieschwundes hat somit mit den unter pathologischen Verhältnissen anzutreffenden Schwankungen des Komplementgehaltes nichts zu tun.* Es darf in diesem Zusammenhange vielleicht auch darauf hingewiesen werden, daß die in der Literatur vorliegenden Erfahrungen über den Einfluß von Krankheiten auf den Komplementgehalt (vgl. z. *Lüdke, Moro, Hans Sachs* und viele andere) keine diagnostisch verwertbaren Ergebnisse gezeitigt haben und daß die Differenzen des Komplementgehaltes beim Erwachsenen sehr regellos zu sein scheinen. So haben auch *Liedtke* und *Körber* bei toluylendiamin- und phosphorvergifteten ikterischen Hunden nur bedeutungslose Schwankungen des Komplementgehaltes beobachtet.

Ad 2. *Es bestehen keinerlei Anhaltspunkte für einen komplexen Bau des trypanociden Körpers.* Schon seine Entdecker *Laveran* und *Mesnil*



bezeichnen den trypanociden Körper des menschlichen Serums als „médicament“: „Le sérum humain a donc sur les trypanosomes du nagana une action microbicide analogue à celle de l'acide arséniceuse.“ Sie betonen weiter seine relativ hohe Thermoresistenz und seine Nichtreaktivierbarkeit durch Komplementzusatz nach Zerstörung bei 64°. Auch nach den Untersuchungen *Goebels* sind keine Parallelen zwischen der Struktur der trypanociden Substanz und der Konstitution der bekannten Antikörper nachzuweisen. Es ist nicht ersichtlich, worauf *Lange* seine den bisherigen Anschauungen widersprechenden Behauptungen gründet. Wir selbst verfügen hier über eigene Erfahrungen, die durchaus den Beobachtungen der französischen Autoren entsprechen. Sie sind in den beiden folgenden Tabellen niedergelegt.

*Tabelle V.*

**Zur Frage der Thermoresistenz und Reaktivierbarkeit der trypanociden Serumsubstanz. Serum subcutan, Nagana intraperitoneal.**

| Tage nach der Infektion | Aktives Menschenserum | | Menschenserum $^1/_2{}^h$ 56° | | Menschenserum $^1/_2{}^h$ 65° | | Menschenserum $^1/_2{}^h$ 65° + 0,5 ccm akt. Meerschw.-S. | | Akt. Meerschweinch.-Serum | Infektionskontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,5 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | |
| | Fr. 17 | Fr. 18 | Fr. 19 | Fr. 20 | Fr. 21 | Fr. 22 | Fr. 25 | Fr. 26 | Fr. 27 | Fr. 16 |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | ++ | +−++ | (+) | (+) | (+) | +−++ |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | +++ | +++ | + | + | + | +++ |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | † | † | ++ | +++ | +++ | † |
| 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | † | † | † | |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |

*Tabelle VI.*

**Zur Frage der Reaktivierbarkeit der trypanociden Serumsubstanz nach Zerstörung bei $^1/_2{}^h$ 65° bei Zusatz von 0,2 ccm aktivem Meerschweinchenserum. Serum subcutan, Nagana intraperitoneal.**

| Tage nach der Infektion | Aktives Menschenserum | | Menschenserum $^1/_2{}^h$ 65° | 0,2 ccm aktives Meerschweinchenserum + Menschenserum $^1/_2{}^h$ 65° in Mengen von: | | Infektionskontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,5 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | 0,5 ccm | |
| | Fr. 30 | Fr. 31 | Fr. 36 | Fr. 34 | Fr. 35 | Fr. 37 |
| 1 | 0 | 0 | (+) | (+) | (+) | (+) |
| 2 | 0 | 0 | +++ | +++ | +++ | ++ |
| 3 | 0 | 0 | † | † | † | +++† |
| 4 | 0 | 0 | | | | |
| 5 | 0 | 0 | | | | |
| 7 | 0 | 0 | | | | |

Wie Fr. 19 und 20 zeigen, bleibt trotz der üblichen Komplementzerstörung, wie sie nach $^1/_2$stündigem Erhitzen auf 56° erzielt wird,

die trypanocide Kraft des jetzt komplementinaktiven Serums anscheinend ungeschwächt erhalten. Erst nach $^1/_2$stündigem Erwärmen des Menschenserums auf 65° wird, wie der jetzt ungehemmte Ablauf der experimentellen Trypanosomeninfektion bei Fr. 21 und 22 beweist, die trypanocide Serumsubstanz zerstört. Eine Reaktivierung dieses Serums ist aber jetzt nicht mehr möglich: Die mit dem 65°-Menschenserum unter Zusatz von frischem Meerschweinchenserum behandelten Mäuse Fr. 25 und 26 erliegen der Infektion in kurzer Zeit. Die leichte Verzögerung des Infektionsverlaufes bei Fr. 25 und 26 ist, wie aus Fr. 27 hervorgeht, auf einen geringfügigen hemmenden Einfluß der größeren Meerschweinchenserummengen zurückzuführen, die hiernach in geringen Spuren manchmal trypanocide Substanzen zu enthalten scheinen. Verringert man den Komplementzusatz auf 0,2 ccm Meerschweinchenserum, so verläuft die Infektion mit dem jetzt künstlich komplementhaltigen, auf 65° erhitzten Serum (vgl. Tab. VI, Fr. 34 u. 35) genau so wie bei dem unbehandelten Kontrolltier Fr. 37.

Wir können somit auch aus den eben geschilderten Versuchsergebnissen den Schluß ziehen, daß die Reaktion des Trypanocidieschwundes in keinen irgendwie ursächlichen Beziehungen zum Komplementgehalt des menschlichen Serums steht und daß für die *Lange*sche These vom komplexen Bau des trypanociden Serumkörpers keine experimentellen Stützen bestehen.

Ad 3. Aus den Befunden von *Ritz*, wonach das in der üblichen Weise gewonnene Mäuseserum nur Mittelstück, nicht vollständiges Komplement enthält und daher in vitro komplexe Immunkörper nicht zu komplettieren vermag, zieht *Lange* den Schluß, daß der lebende Mauskörper kein Komplement zu bilden vermag. In früheren Untersuchungen über die Genese des Rezidivs bei der experimentellen Trypanosomeninfektion aus dem *Morgenroth*schen und *Minkowski*schen Laboratorium hat der eine von uns (*Rosenthal*) schon darauf hingewiesen, daß Trypanolyse und Hämolyse bei entsprechend immunisierten Mäusen sich in vivo öfters nachweisen lasse, daß also in vivo Komplement bei Mäusen vorhanden sein muß. In schönen Versuchen haben weiter *Bieling* und *Isaac* am Hämolysinikterus der Maus gezeigt, daß in der Maus sogar eine reichliche Komplementbildung stattfindet, als deren Produktionsstätte im wesentlichen das Milzsystem anzusehen ist. Es steht somit außer Zweifel, daß der Maus komplettierende Eigenschaften zukommen.

Man kann aber den Beweis für die Unrichtigkeit der *Lange*schen Anschauung auch auf direktem experimentellen Wege erbringen, indem man die Versuche mit den ikterischen, an trypanociden Körpern verarmten Seris statt in der Maus in der ihr nahestehenden Ratte ablaufen läßt, deren Serum, wie wir einer brieflichen Mitteilung von *Hugo Braun* verdanken, sämtliche Bestandteile des Komplementes auch

im Reagensglasversuche aufweist. Ein solcher Versuch ist in Tabelle VII zusammengefaßt.

*Tabelle VII.*

Reaktion des Trypanocidieschwundes im komplementreichen Medium des Rattenblutes. Schwerer mechanischer Ikterus bei komplettem Choledochusverschluß durch Tumor. Serum subcutan, Nagana intraperitoneal.

| Tage nach der Infektion | Ikterisches Serum pro 20 g Ratte | | | Normalserum pro 20 g Ratte | | | Infektionskontrolle |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,4 ccm | 0,3 ccm | 0,2 ccm | 0,4 ccm | 0,3 ccm | 0,2 ccm | |
| | Fr. 95 | Fr. 97 | Fr. 99 | Fr. 96 | Fr. 98 | Fr. 100 | Fr. 101 |
| 1 | + | + | + | 0 | 0 | 0 | + |
| 2 | ++ | ++ | ++ | 0 | 0 | 0 | ++ |
| 3 | +++ | +++ | +++ | 0 | 0 | 0 | +++ |
| 4 | † | † | † | 0 | 0 | 0 | † |
| 5 | | | | 0 | 0 | 0 | |
| 7 | | | | 0 | 0 | 0 | |

Wir sehen, daß die Reaktion des Trypanocidieschwundes in genau der gleichen Weise wie in der Maus auch in der Ratte (vgl. Fr. 95, 97, 99) in die Erscheinung tritt, daß also *die Reaktion auch im sicher komplementreichen Medium typisch verläuft. Das Phänomen des Trypanocidieschwundes bei Leberkranken hat somit entgegen den Behauptungen Langes auch nicht das mindeste mit dem Komplementtiter zu tun.*

Der prinzipielle Fehler, in den *Lange* bei seinen Ausführungen verfallen ist, liegt in der Gleichstellung der Struktur der trypanociden Substanz mit dem Bau der bekannten komplexen Antikörper. Wie in späteren Mitteilungen noch zu begründen sein wird, muß man sich bei der Erforschung des Wesens des trypanociden Serumkörpers endgültig von der Anschauung freimachen, daß für ihn die Vorstellungen über den Bau der bisher bekannten Schutzkörper des Normalserums Geltung haben. Hiergegen sprechen schon die beiden Kardinaleigenschaften der trypanociden Substanz, die ihr von vornherein eine eigenartige Sonderstellung unter den physiologischen Stoffen des Serums einräumen: nämlich daß *sie in besonders hohem, fast elektivem Maße gegenüber allen Tierarten dem menschlichen Blute eigen ist und daß sie eng gebunden erscheint an die Funktionstüchtigkeit der menschlichen Leber.*

## Literatur.

[1]) *Bieling* und *Isaac*, Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. **25**, H. 1/2. 1921. — [2]) *Bieling* und *Isaac*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 29. — [3]) *Bieling* und *Isaac*, Kongr. f. inn. Med. 1921/22. — [4]) *Ehrlich*, Berichte d. dtsch. chem. Ges. **42**, 17. — [5]) *Goldmann*, Beitr. z. klin. Chirurg. **78**, 1. 1912. — [6]) *Goebel*, Ann. de l'inst. Pasteur **11**, 802. 1902. — [7]) *Lange*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 21/22. — [8]) *Laveran* und *Mesnil*, Trypanosomes et Trypanosomiases. Paris 1904. — [9]) *Leichtentritt*, Jahrbuch





für Kinderheilkunde 1922. — [10]) *Liedtke* und *Körber*, Arch. f. Verdauungskrankheiten 1922. **29**. — [11]) *Morawitz* und *Bierich*, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **56**, 115. 1907. — [12]) *Moro*, Münch. med. Wochenschr. 1907, Nr. 21 u. 31. — [13]) *Moro*, Über das Verhalten hämolytischer Serumstoffe beim gesunden und kranken Kind. Bergmann, Wiesbaden 1908. — [14]) *Neufeld* und *Haendel*, Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt **28**, H. 1/3. 1908. — [15]) *Platau, L.*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **81**. 1916, und Inaug.-Diss. 1916. — [16]) *Ritz*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **9**, 333. 1911. — [17]) *Rosenthal*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **74**, 489. 1913. — [18]) *Rosenthal*, *Krüger* und *Nossen*, Berl. klin. Wochenschr. 1921, Nr. 16, S. 382; Nr. 37, S. 1093. — [19]) *Rosenthal* und *Kleemann*, Berl. klin. Wochenschr. 1915, Nr. 4. — [20]) *Rosenthal* und *Freund*, Klin. Wochenschr. 1922. I. Jahrgang, Nr. 35. — [21]) *Sachs*, Hämolysine des Blutserums. Kolle-Wassermann. Bd. **2**. S. 866. — [22]) *Sachs* und *Altmann*. Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 10 u. 14. — [23]) *Zeiss*, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhygiene **25**, 302. 1921.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Heidelberg [Direktor: Geh. Hofrat Prof. Dr. *H. Kossel*].)

# Bakterientötende Kräfte im Serum von Gesunden und Kranken.

Von
**E. G. Dresel und W. Keller.**

In Studien zur unspezifischen Reiztherapie über die experimentelle Steigerung der Anthracocidie im Blute haben *Dresel* und *Freund*[1]) nachgewiesen, daß das normalerweise nicht anthracocid wirkende menschliche Serum milzbrandfeindliche Kraft erlangen kann, ohne daß es sich um einen Immunisierungsprozeß im gewöhnlichen Sinne handelt. Beim Kaninchen wurde festgestellt, daß im strömenden Blute eine Vermehrung der anthracociden Stoffe außer durch unspezifische Reiztherapie auch durch pathologische Zustände oder durch Schwangerschaft ausgelöst werden konnte.

Daher sollte geprüft werden, wie sich menschliches Serum bei pathologischen Zuständen, während der Menstruation und bei Neugeborenen gegenüber Bakterien verhält. Im Anschluß an die vorige Mitteilung wurde in der Hauptsache das Verhalten gegenüber Milzbrandbacillen, in einer Reihe der Serumproben gleichzeitig gegen Milzbrand- und Typhusbacillen geprüft, weil *Dresel* und *Freund* zu dem Ergebnisse gekommen waren, daß die wirksamen Stoffe beim Menschen auch noch aus anderen Zellen, als den Blutplättchen stammen könnten; d. h. daß es sich nicht ausschließlich um Plakine handeln müsse.

*Versuchsanordnung.*

230 Sera von gesunden und kranken Menschen wurden folgenderweise untersucht: Jedes niemals über 48 Stunden alte Serum wurde zu je 0,5 ccm auf 4 Spitzgläschen verteilt. Von einer 24stündigen sporenfreien, sehr gut durchgeschüttelten Milzbrandbacillenbouillonkultur wurde mit Bouillon eine Verdünnung 1 : 1000 hergestellt und davon jedem Spitzgläschen aus gleichkalibrierter Pipette ein Tropfen zugesetzt. Das 1. Spitzgläschen wurde sofort durch Ausgießen zur Agarplatte verarbeitet, das 2. nach 1stündigem, das 3. nach 4stündigem und das 4. nach 6stündigem Verweilen im Brutschrank bei 37°. Als Kontrolle dienten zu jedem Versuch 4 Spitzgläschen, enthaltend 0,5 ccm Bouillon und 1 Tropfen der Milzbrandverdünnung, die sofort, nach 1, 4 und 6 Stunden Verweilens im Brutschrank zu Agarplatten verarbeitet wurden.



Nach 24stündigem Aufenthalt im Brutschrank wurden die aufgegangenen Kolonien gezählt. Nach 48stündigem Aufenthalt im Brutschrank trat keine nennenswerte Vermehrung der Kolonien auf, so daß die Versuche stets nach 24 Stunden abgeschlossen werden konnten.

Der verwandte Milzbrandstamm, ein alter Sammlungsstamm des Hygienischen Instituts, zeichnete sich von vornherein durch geringe Neigung zum Sporenbilden aus; außerdem ließen sich die Milzbrandfäden in der Bouillonkultur leicht durch Schütteln verteilen. Als nach $1^1/_2$jährigem Gebrauch bei fast täglichem Überimpfen der Stamm auf den Agarkontrollplatten nicht mehr ganz charakteristisch wuchs — die Kolonien ließen die feinen Randverschlingungen vermissen —, wurden eine Reihe Sera mit 4 weiteren verschiedenen Milzbrandstämmen geprüft. Davon waren 2 Stämme 1912 und 1914 aus Material von erkrankten Menschen gezüchtet, 2 stammten aus sibirischen Mähnen und indischem Ziegenhaar. Als alle 5 Stämme gleichmäßig durch die Sera beeinflußt wurden, wurde für die letzten 100 Sera Stamm III aus sibirischen Mähnen benutzt. Auch er zeigt eine leichte Verzögerung in der Sporenbildung und ist für Mäuse pathogen. Der ursprüngliche Stamm I hat die Fähigkeit, Sporen zu bilden, ganz eingebüßt, und sie auch nach einer Mauspassage nicht wieder erlangt. Er tötete eine weiße Maus, die mit 1 Öse Agarkultur an der Schwanzwurzel geimpft war, nach 60 Stunden, und zwar noch, als er wegen seines uncharakteristischen Wachstums von den Untersuchungen ausgeschlossen war*).

Es sei noch erwähnt, daß alle zu den Versuchen benutzten Kochungen von Bouillon und Agar mit Pferdefleisch hergestellt waren und daß

*) In seiner Arbeit: Über den Einfluß intravenöser Proteinkörperzufuhr auf die Bactericidie des Normalserums, kommt *O. Pfeiler*[2]) zu dem Ergebnis, daß seine Beobachtungen über den Einfluß des Caseosans auf die milzbrandtötende Kraft des *Kaninchenserums* im Gegensatz zu den von *Dresel* und *Freund* mitgeteilten Befunden ständen. Dazu ist zu bemerken: 1. Unsere Mitteilungen beziehen sich nicht auf Kaninchenserum, das stets starke anthracocide Kräfte enthält, sondern auf die Steigerung der Anthracocidie im *Plasma und im Frischblutextrakt* beim Kaninchen nach Caseosaninjektionen und anderen unspezifischen Reizen. Also schon aus diesem Grunde lassen sich die Ergebnisse überhaupt nicht vergleichen. Dazu kommt noch 2., daß uns die von *O. Pfeiler* angewandte Versuchsanordnung bedenklich scheint. Seine Keimaussaatzahlen bewegen sich zwischen 85000 und 120000 Keimen im Kubikzentimeter Serum, während wir bei Milzbrandbacillen die Zahlen von 2000 Keimen in $^1/_2$ ccm, also von 4000 in einem Kubikzentimeter Serum nicht überschritten. Es ist eine alte Erfahrung, daß bei bactericiden Versuchen sehr viel für die Ergebnisse von der Menge der Aussaat abhängt, da es sich um quantitative Verhältnisse handelt. Außerdem halten wir die von uns angewandte Technik des Plattengußverfahrens für solche Untersuchungen, bei denen es sich um die Auszählung von Keimen handelt, dem von *Pfeiler* angewandten Strichverfahren für überlegen. Daß bei der Verwendung durch *Pfeiler* der Milzbrandbacillenstamm „Heidelberg" für Mäuse nicht pathogen war, könnte eine Erklärung wohl nur in der Verschiedenheit der zur Züchtung verwandten Nährböden finden. *Dresel* und *Freund.*



die Wasserstoffionenkonzentration mit dem Komparator nach *Michaelis* geprüft wurde, um gleiche Wachstumsbedingungen zu sichern. Die Milzbrandstämme zeigten sich nämlich gegen Schwankungen der Wasserstoffionenkonzentration recht empfindlich.

Um die Veröffentlichung nicht mit den Protokollen zu überladen, sei auf die Arbeit von *Dresel* und *Freund* verwiesen, wo sich auf S. 327ff. ausführliche Protokolle finden, und zwar negative und positive. Hier sollen bei der großen Zahl der untersuchten Sera immer nur die Keimzahl der sofortigen Bouillonkontrolle und als zweite die niederste Keimzahl, welche durch die anthracociden Stoffe erzielt wurde, angegeben werden. Es bedeutet also die Schreibweise 1000/0, daß die Keimzahl in der Bouillonkontrolle sofort 1000 betrug, während in den Serumröhrchen, und zwar entweder sofort oder nach 1, 4 und 6 Stunden die Keimzahl auf 0 sank. In allen Fällen, in denen eine glatte Abtötung aller eingebrachten Keime nicht eintrat, ist als zweite Zahl die niedrigste Keimzahl der Serumagarplatten angegeben. Diese niedrigste Keimzahl fand sich in der Mehrzahl der Untersuchungen schon nach 1 oder 4 Stunden, nicht selten auch erst nach 6 Stunden. In diesen Fällen zeigte sich immer eine gleichmäßige Abnahme. Waren die bactericiden Kräfte des Serums schon nach 1 oder nach 4 Stunden erschöpft, ohne daß alle eingebrachten Milzbrandkeime abgetötet waren, so tritt selbstverständlich in der Untersuchung der 4. oder 6. Stunde wieder eine Zunahme auf, die dann aber regelmäßig weit hinter dem Anwachsen der Keimzahlen in den Kontrollen zurückblieb. Ein solches Verhalten schwächerer Anthracocidie fand sich bei den Versuchen mit Normalserum niemals.

### *Versuche mit Serum gesunder Menschen.*

Bei der Untersuchung des Serums von Männern mußte berücksichtigt werden, ob nicht etwa die Typhus- und Choleraschutzimpfung der Kriegszeit noch nachwirkte, trotzdem es ja durch die seitdem vergangene Zeit unwahrscheinlich war. Zur Untersuchung kamen die Sera von 12 klinisch völlig gesunden Männern, die auch längere Zeit vorher keinerlei Erkrankungen durchgemacht hatten. Geimpft waren davon im Kriege gegen Typhus und Cholera mit Sicherheit 7, sicher nicht geimpft 1, die übrigen konnten keine zuverlässigen Angaben machen. Im Serum dieser 12 Männer fanden sich keine oder nur geringe Spuren von anthracociden Stoffen. Ebenso verhielten sich die Sera von 5 jugendlichen Frauen. Da *Dresel* und *Freund* bei Kaninchen eine Steigerung der milzbrandtötenden Kräfte im Plasma durch Aderlässe festgestellt hatten und da inzwischen im Serum von Frauen während der Menses das Auftreten von milzbrandbacillentötenden Kräften sichergestellt war, mußte bei Serumproben von Frauen, die als normale



gelten sollten, darauf geachtet werden, daß nicht nur Schutzimpfungen gegen Typhus und Cholera nicht vorausgegangen waren, sondern auch die Blutentnahme nicht mit der Menstruation zusammenfiel. 4 Frauen waren nicht geimpft, alle 5 befanden sich im Menstruationsintervall zwischen 2—10 Tagen vor der kommenden Menstruation. Alle 5 hatten keine oder nur ganz geringe anthracocide Kräfte im Blute.

Ergebnis: Klinisch gesunde Männer und Frauen, diese im Menstruationsintervall, haben im Serum keine oder nur geringe Spuren von anthracociden Kräften. Eine vor mindestens 3 Jahren vorausgegangene Schutzimpfung gegen Typhus und Cholera hat keinen Einfluß mehr auf die Bildung von milzbrandfeinlichen Kräften.

*Serum von Neugeborenen.*

Da wir in der vorigen Mitteilung festgestellt hatten, daß Schwangerschaft in den letzten Wochen im Serum gesunder Frauen starke Anthracocidie hervorruft, interessierte es, Serum von Neugeborenen auf bakterienfeindliche Kräfte zu untersuchen. Die Serumproben verdanken wir der Frauenklinik; dort wurden die Blutproben beim Abnabeln aus der Nabelvene gewonnen. Untersucht wurden 22 Sera gegen Milzbrand und 16 davon auch gegen Typhusbacillen.

Die bactericide Kraft gegen Milzbrand war:

600/0 — 600/0 — 600/0 — 580/0 — 580/10 — 580/52 — 580/0 — 580/0 — 350/17 — 350/0 — 350/85 — 350/32 — 350/70 — 350/53 — 260/0 — 152/0 — 152/6 — 152/1 — 190/0 — 350/18 — 350/81 — 350/0.

Die bactericide Kraft gegen Typhus war:

3000/0 — 3000/0 — 3000/25 — 3000/0 — 2500/0 — 2500/0 — 2500/11 — 3000/0 — 3000/50 — 3000/0 , in 6 weiteren Fällen fand bei 3000 ausgesäten Keimen eine sehr starke Abnahme statt.

Ergebnis: Serum von Neugeborenen enthält große Mengen von bactericiden Stoffen gegen Milzbrand- und Typhusbacillen.

*Serum während der Menstruation.*

Zur Untersuchung kamen 14 Sera von klinisch völlig gesunden jugendlichen weiblichen Personen, und zwar 5 am 1., 5 am 2., 1 am 4., und 3 am 7. Tage der Menstruation.

Die bactericide Kraft gegen Milzbrandbacillen war:

1. Tag: 500/265 — 500/12 — 500/125 — 960/36 — 350/8; 2. Tag: 520/16 — 400/0 — 400/260 — 500/175 — 800/155; 4. Tag: *960/400*; 7. Tag: *750/5* — 960/120 — 630/45.

Die Sera von 2 Frauen konnten im Intervall 3 Tage vor den Menses nochmals untersucht werden und enthielten dann keine milzbrandfeindlichen Stoffe. Die Ergebnisse bei diesen beiden während der Menses sind im Druck hervorgehoben.



Ergebnis: Während der Menstruation enthält das Serum von klinisch gesunden Frauen große Mengen von milzbrandfeindlichen Kräften, die im Intervall kurz vor der Menstruation wieder verschwunden sind.

*Sera von klinisch kranken Menschen.*

Untersucht wurden 31 Fälle von verschiedenen *fieberhaften* akuten Infektionskrankheiten. Es ergaben Pneumonien: 4; 630/0 — 320/0 — 1200/0 — 950/170 (10 Tage nach der Entfieberung nur noch 1200/560); interlobuläres Exsudat: 1; 600/0; Grippe: 2; 500/0 — 750/0; außerdem konnten 3 Sera von Patienten untersucht werden, die eine schwere Grippe durchgemacht hatten. Nr. 1 ergab 4 Wochen nach der Genesung 960/0; Nr. 2 6 Wochen nach der Genesung 750/11; Nr. 3 $^1/_4$ Jahr nach der Genesung 960/500; Sepsis: 1: 630/0; 4 Patienten einer ungeklärten Saalepidemie, die wegen anderer geringer Beschwerden im Krankenhaus waren und plötzlich mit hohem Fieber bis 39,8 ganz akut für einige Tage erkrankten: 620/0 — 340/0 — 349/0 — 950/4. Scharlachfälle: 2; 500/60 — 1200/0. Ein dritter Scharlachkranker hatte während der Schuppung nach der Entfieberung 860/80. Pyogene Dermatose: 1; 860/13. Polyarthritis rheumatica: 1; 470/0. Erythema exsud. nach Gelenkrheumatismus: 1; 260/0; Arthritis gonorrhoica: 2; 880/0 — 1200/0; derselbe Patient nach Entfieberung 1200/0. Dazu noch ein Fall ohne Fieber: 340/80. Parametritis: 1; 740/0. Cystitis und Pyelitis: 7; 470/0 — 800/30 — 960/15 — 960/3 — 340/0 — 1000/0 und ein Kranker, dessen Serum 3 mal im Abstand nach 8 Tagen und 6 Wochen untersucht wurde: 600/0; 740/0; 340/0. Entzündliche Prozesse nach Abort: 2; 800/0 — 314/0. (Diese 2 Fälle sind nicht eindeutig, ebenso wie der folgende, weil die Schwangerschaft mitsprechen könnte.) Im ersten Fall handelt es sich um einen künstlichen Abort im 3. Monat, im zweiten um einen Abort bei Placentarpolyp im 5. Monat. Beim nächsten Fall, einer fieberhalten Bronchitis, lag Schwangerschaft im 6. Monat vor: 1200/15. Eine Erkrankung an Pleuritis exsudativa fraglicher Ursache: 1200/0.

Ergebnis: 40 Sera von akuten fieberhaften Infektionskrankheiten weisen sehr starke milzbrandfeindliche Stoffe auf.

*Sera bei Erkrankungen an Tuberkulose.*

Bei 3 Erkrankungen an Tuberkulose, die klinisch und durch Röntgenbefund gesichert waren, die aber keine erhöhten Temperaturen und im Auswurf keine Tuberkelbacillen hatten, bei denen es sich um cirrhotische Spitzen- und Oberlappenprozesse handelte, ergab die Serumuntersuchung: 269/10— 800/600 und 860/880. Der erste Fall wies einen schlechten Allgemeinzustand auf bei geringem Hämoglobingehalt des Blutes und sekundär anämischen Erscheinungen, die wohl



für das Vorhandensein der anthracociden Stoffe verantwortlich gemacht werden müssen.

Ergebnis: Bei alten fieberlosen cirrhotischen tuberkulösen Prozessen der Lunge können anthracocide Kräfte fehlen oder in geringer Menge vorhanden sein.

Bei 7 Erkrankungen an Tuberkulose mit ganz geringen, meist morgendlichen Temperatursteigerungen von einigen $^1/_{10}$ Graden über 37° mit sicherem Röntgenbefund, von denen 2 keine und 5 Tuberkelbacillen im Sputum hatten, ergab die Serumuntersuchung: 600/400 — 340/160 — 1000/220 — 800/250 — 1200/770 — 800/4 — 500/1. 5 von den 7 Personen waren Frauen, bei denen das Blut im Menstruationsintervall entnommen wurde. Die beiden letzten Fälle mit dem großen Ausschlag sind nicht ganz eindeutig. Bei dem vorletzten fand sich Blut im Stuhl, doch konnte die Frage der Darmtuberkulose oder des frischen Ulcus ventriculi nicht entschieden werden. Der letzte Kranke hatte 4 Wochen vor der Blutentnahme eine Hämoptoë gehabt.

Ergebnis: Offene und geschlossene mit geringen Temperatursteigerungen verlaufende tuberkulöse Lungenerkrankungen können eine beträchtliche Steigerung der anthracociden Kräfte im Serum hervorrufen.

Bei 11 Erkrankungen an Tuberkulose mit meist hochfieberhaften Temperaturen und positivem Tuberkelbacillenbefund in allen Fällen ergab die Serumuntersuchung: 1200/0 — 1200/6 — 260/0 — 470/0 — 340/0 — 1200/0 — 1200/14 — 800/0 — 560/0 — 500/0 — 1200/0. Darunter befinden sich 4 Frauen, deren Blut im Menstruationsintervall entnommen wurde.

Von diesen Erkrankten starben 3 innerhalb 1 Woche nach der Blutentnahme, 3 in einem Zeitraum bis zu $1^1/_2$ Monaten. Es handelte sich in allen 11 Fällen um schwere ausgedehnte Tuberkulosen. Von den noch lebenden 5 hatten 4 auf die Lunge beschränkte Erkrankungen, 1 außerdem noch eine Peritonitis exsudativa tuberculosa. Bei den 6 Gestorbenen ergab die Sektion in einem Falle Lungen- und Kehlkopftuberkulose, 1 mal Lungen- und Darmtuberkulose, 1 mal Lungentuberkulose und allgemeine Sepsis, 1 mal Lungen-, allgemeine Drüsen- und Genitaltuberkulose, 1 mal Lungen- und Bauchfelltuberkulose und 1 mal Lungen- und Miliartuberkulose.

Ergebnis: Serum von Menschen mit ausgedehnter Tuberkulose und hohem Fieber enthält sehr reichliche milzbrandbacillentötende Kräfte. Schlüsse auf Beziehungen zwischen milzbrandtötender Kraft des Serums und Ausdehnung bzw. Form der Erkrankung lassen sich bisher nicht ziehen.

*Sera von Luetikern.*

Bei 7 Erkrankungen an Lues ohne Fieber und ohne vorausgegangene antiluetische Behandlung ergab die Serumuntersuchung: 190/0 —

630/140 — 1100/650 — 620/0 — 340/0 — 560/0 — 620/60. Bei allen 7 Fällen war die WaR. positiv. Es handelt sich um eine Encephalitis luetica, eine Lues larvata, eine Lues hereditaria, um eine luetische Drüsenerkrankung, einen frischen Infekt und 2 bisher nicht behandelte Patienten mit Herzerkrankungen. Bei 5 behandelten Fällen, davon 3 mit Quecksilber- und 2 mit Salvarsankuren, die teilweise jahrelang zurücklagen, ergab die Serumuntersuchung: 600/0 — 620/9 — 340/0 — 1600/600 — 620/120. Die WaR. war in allen Fällen positiv. Bei 2 Fällen von Tabes dorsalis mit positivem Wassermann, von denen der erste 1914 und 1921 kombiniert behandelt ist, während der zweite $1^1/_2$ Jahre krank und unbehandelt ist, ergab die Untersuchung: 2000/12 — 1000/5.

Besonders erwähnenswert sind 2 Fälle; der eine, der unbehandelt 1100/650 aufwies und 5 Wochen später nach einer beendigten Quecksilberkur im Serum 2 Stunden nach einer Salvarsaninjektion alle eingebrachten 620 Milzbrandkeime abtötete.

Ein weiterer Fall von Angina luica konnte 3 mal untersucht werden. Die WaR. war zweifelhaft. Die erste Serumprobe ergab 340/0, die zweite nach 10 Tagen 860/5, die dritte nach weiteren 14 Tagen 800/300. Zwischen der 2. und 3. Blutentnahme, 6 Tage vor der letzten Entnahme wurde 0,3 Neosalvarsan injiziert.

Ergebnis: Bei Lues, und zwar bei unbehandelter und behandelter, finden sich im Serum sehr große Mengen von milzbrandbacillentötenden Kräften, die anscheinend durch die Behandlung gesteigert oder vermindert werden zu können scheinen.

### *Anämien.*

Die Serumuntersuchungen von 2 Kranken mit Anaemia perniciosa ergaben: 1000/0 — 1000/0; bei einer Leukämie 960/0; einer Pseudoleukämie 260/0. Bei 7 sekundären Anämien im Anschluß an ein Ulcus ventriculi ergab sich: 1000/0 — 800/220 — 960/240 — 750/2 — 751/1 — 630/0 — 340/0; bei einer im Anschluß an ein Ulcus duodeni 320/0. Bei 4 Carcinom-Kachexien ergab sich: 314/0 — 620/0 — 350/0 — 350/15. Das Serum eines Falles von Beckentumor ergab 350/75; das eines Oberschenkelsarkoms 350/7. In einem Fall von Morbus Banti ergab sich: 260/70.

Ergebnis: Bei Anämien und sekundären Anämien findet sich starke Anthracocidie.

### *Rheumatische Erkrankungen.*

In 3 Fällen von Gelenkrheumatismus mit Salicyltherapie ergab sich im Serum: 2000/0 — 630/1 — 630/1, in 2 Fällen ohne Therapie: 190/0 und 340/0.

Ergebnis: Bei rheumatischen Gelenkentzündungen findet sich mit und ohne Salicyltherapie starke Anthracocidie.



*Lebererkrankungen.*

Untersucht wurden 7 Fälle von Lebererkrankungen mit folgendem Ergebnis: Cirrhosis hepatis: 1; 460/0; Ikterus bei Dystrophia adiposogenitalis: 1; 340/7; Cholangitis: 1; 560/0; Cholecystitis: 1; 314/2; Cholelithiasis: 3; 340/0 — 560/10 — 325/65.

Ergebnis: Bei Lebererkrankungen treten anthracocide Stoffe im Serum auf.

*Chronische Nierenleiden.*

Drei Sera bei chronischen Nephritiden ergaben: 1000/0 — 1600/700 — 960/300. Ein Fall von Urämie konnte 4 mal untersucht werden. Bei der ersten Blutentnahme ergab sich 880/26; 5 Tage später 900/23; nach 5 weiteren Tagen 1100/1060, nach weiteren 3 Tagen 960/0. Worauf der fast negative Befund bei der 3. Blutentnahme zurückzuführen ist, läßt sich nicht sicher entscheiden. Vielleicht müssen die beiden vorausgegangenen großen Aderlässe dafür verantwortlich gemacht werden, doch dann würde das Auftreten der starken Anthracocidie nach weiteren 3 Tagen unerklärlich sein.

Ergebnis: Bei chronischen Nierenleiden treten Anthracocidine auf.

*Chronische Herz- und Gefäßerkrankungen.*

Die Untersuchung des Serums in einem Falle von Mitralinsuffizienz mit Stenose ergab 400/75; in einem Fall von kompensiertem Vitium cordis bei einem im Kriege erlittenen Lungenschuß 1000/28; bei einem Fall von Hypertonie mit Atherosklerose 1000/1; bei Herzbeutelbeschwerden mit subfebrilen Temperaturen 960/226; in 2 Fällen von Atherosklerose mit negativem Wassermann 190/0 — 2000/7; bei einem Fall von Apoplexie mit Mitralstenose und negativem Wassermann 560/200; bei einem Fall von Dysbasia angiosclerotica 740/45; bei einem Fall von schwerem Nicotinmißbrauch und Nicotinvergiftung 340/28.

Ergebnis: Bei chronischen Herz- und Gefäßerkrankungen treten reichliche milzbrandbacillentötende Stoffe auf.

*Chronische Erkrankungen.*

Die Untersuchung des Serums ergab in einem Fall von chronischer Bronchitis 560/30; bei einer chronischen Dysenterie mit Rectalgeschwüren 1000/0; bei einer anderen 630/22; in einem Falle von jahrelangen Kreuzschmerzen nach Verheben 152/0; bei einer Querschnittsmyelitis nach Panaritium 520/3; bei eine Spondylitis traumatica 1600/112; bei zwei paravertebralen Abscessen 620/20 — 560/15; bei einer Epididymitis gonorrh. 750/336.

Ergebnis: Bei chronischen entzündlichen Prozessen treten Anthracocidine in erheblichen Mengen auf.



*Konstitutionelle Erkrankungen.*

Die Serumuntersuchung ergab in einem Falle von Diabetes mellitus mit chronischer Neuritis und Gingivitis 470/0; in einem Falle von Dystrophia adiposogenitalis 740/0; in einem Falle von Thyreoidismus 1000/140; in einem Falle von konstitutionellem Ekzem mit Eosinophilie 560/350; bei einem Falle von Jacksonepilepsie 1000/260.

Ergebnis: Bei verschiedenen konstitutionellen Erkrankungen ließen sich im Serum mittelstarke bis starke Mengen von milzbrandbacillenfeindlichen Kräften nachweisen.

*Verschiedene Erkrankungen.*

Die Serumuntersuchung ergab bei einer Erkrankung an chronischer Cephalaea 320/60, bei einer an chronischer Malaria mit Pleocytose und Dilatatio cordis 1000/690, bei einer chronischen Ischias unter Chinintherapie 880/155; bei einer Gastroptose 1000/21. Dazu kommen noch 3 Erkrankungen an Neurasthenie; der erste hatte eine Schockreaktion mit leicht erhöhten Temperaturen, die WaR. war negativ: 630/80; der zweite war ein starker Raucher und litt an chronischen Anginen: 560/1; bei dem dritten war kein Befund zu erheben, ihm war am Tage zuvor der Magen ausgehebert: 1000/660.

Außerdem wiesen noch die Sera von 3 klinisch gesunden Menschen starke milzbrandbacillenfeindliche Stoffe auf. Es handelt sich um einen Arzt mit im Kriege amputiertem Oberschenkel bei umfangreicher Muskelzertrümmerung am Stumpfe: 750/5; um einen Mann, der im Kriege einen schweren Lungenschuß erlitt und vor einem Jahre eine Magen- und Appendixoperation durchmachte: 2000/4; um eine Ärztin (im Menstruationsintervall), der vor einem $^1/_2$ Jahre mehrere große Aderlässe zu wissenschaftlichen Untersuchungen gemacht waren: 960/175.

*Verschwinden der Anthracocidie.*

Die durch irgendeinen Reiz, wie akute oder chronische Infektion mit und ohne Fieber, oder Blutung, oder Schwangerschaft, oder degenerative und narbige Prozesse ausgelöste Anthracocidie scheint nach Abklingen des Reizes zu verschwinden.

Eine unklare fieberhafte Infektion mit Fieber bis über 39° tötete auf der Höhe des Fiebers die in das Serum eingebrachten Milzbrandbacillen restlos ab, dagegen 14 Tage nach der Entfieberung blieben von 1200 eingebrachten Milzbrandkeimen 260 am Leben. Bei einer Lungenentzündung, die auf der Höhe des Fiebers von 950 Keimen 170 nicht abtötete, blieben nach der Entfieberung von 1200 Keimen 506 am Leben.

Andererseits scheint ein zu starker Reiz durch Häufung von Krankheitsprozessen im Körper oder durch therapeutische Einwirkung die erwartete Anthracocidie nicht mehr auszulösen.



Im Serum einer perniziösen Anämie mit 2 780 000 roten und 5000 weißen Blutkörperchen, die seit 2 Monaten mit Elektroferrol und in den letzten 2 Wochen vor der Blutentnahme täglich mit 3 mal 0,05 Arsacetin behandelt war, fand sich überhaupt keine Anthracocidie.

Im Serum einer Patientin mit chronischer Lungentuberkulose, Cholecystitis und Cholelithiasis, deren Blut während der Periode entnommen wurde, wurden von 800 eingebrachten Milzbrandkeimen nur 100 abgetötet.

Das Serum einer schweren Urämie mit Retinitis enthielt keine anthracociden Stoffe.

Bei einer Patientin mit angeborener Lues und chronischer Arthritis bei Salicyltherapie im 9. Schwangerschaftsmonat blieben von 1200 eingebrachten Milzbrandkeimen im Serum 900 am Leben.

Im Serum einer Angina luica ergab sich folgender Befund: Das Serum der unbehandelten Patientin tötete 340 Milzbrandbacillen ab. 10 Tage später blieben von 860 eingebrachten Milzbrandbacillen 5 am Leben, nach weiteren 14 Tagen, 6 Tage nach einer Salvarsaninjektion von 0,3, blieben von 860 eingebrachten Milzbrandkeimen 300 am Leben.

Das Serum einer Frau mit schwerem Diabetes mellitus (4,3% Sacch. Aceton und Acetessigsäure ++), das am zweiten Tage der Menses entnommen wurde, zeigte keine Anthracocidie.

*Verhalten des Serums gegen Milzbrand- und Typhusbacillen.*

Weiterhin sollte die Frage beantwortet werden, ob die bakterientötenden Kräfte im Serum von Gesunden und Kranken außer Milzbrandbacillen auch andere Bakterienarten abtöten.

Untersucht wurden 50 Sera gleichzeitig auf Bactericidie gegen Milzbrand- und Typhusbacillen. Darunter waren die Sera von 5 wiederholt während des Krieges mit Typhusschutzimpfstoff geimpften und von 8 nicht geimpften Männern, 21 Sera stammten von Frauen, und zwar 9 von noch nicht oder nicht mehr menstruierten, während die übrigen 12 alle am ersten oder zweiten Tage der Menstruation waren. Von diesen 12 Seren stammten 7 von klinisch völlig gesunden Frauen. Die übrigen 27 Personen waren wegen klinischer Befunde bettlägerig krank. Alle Sera wiesen starke abtötende Stoffe gegen Milzbrand auf. 19 töteten die eingebrachten Milzbrandbacillen restlos ab. 32 Sera töteten die in der Aussaatmenge zwischen 1600 und 6000 schwankenden Typhusbacillen ab, bei zweien zeigte sich eine sehr starke Verminderung der eingebrachten Typhusbacillen.

In 16 Fällen konnte Nabelvenenblutserum von Neugeborenen gegen Milzbrand- und Typhusbacillen geprüft werden. Ebenso wie die Milzbrandbacillen wurden in 7 Fällen die eingebrachten 3000 Typhusbacillen restlos abgetötet, in 3 Fällen blieben je 11, 25 und 50 Typhus-



keime am Leben, in 6 Fällen fand eine sehr starke Verminderung der Zahl der Typhusbacillen statt.

Es wäre verlockend, dieses Ergebnis mit anderen Tatsachen in Beziehung zu setzen, die bisher bei unspezifischen Reizwirkungen in den Körpersäften durch biologische, physikalische und chemische Untersuchungsmethoden festgestellt sind. Doch halten wir es für notwendig, ehe an die bisherigen Ergebnisse Hypothesen angeknüpft werden, die wir uns für später vorbehalten, weitere Tatsachen zu sammeln.

### *Zusammenfassung.*

Im Serum klinisch gesunder Männer und bei klinisch gesunden Frauen im Menstruationsintervall finden sich keine Anthracocidine.

Das Serum klinisch gesunder Frauen enthält während der Menstruation bactericide Stoffe gegen Milzbrandbacillen, die nach 14 Tagen wieder verschwunden sind.

Im Nabelvenenblut gesunder Neugeborener finden sich Bactericidine gegen Milzbrand- und Typhusbacillen.

Sera von klinisch kranken Menschen enthalten sehr reichliche Anthracocidine, und zwar bei fieberhaft akuten und chronischen Infektionskrankheiten; bei Infektionskrankheiten ohne Fieber (chronische Tuberkulose, Lues, Rheumatismus); bei Bluterkrankungen; bei chronischen Krankheiten mit Organveränderungen, wie Lebererkrankungen, Herz- und Gefäßerkrankungen und chronischen Nierenerkrankungen; bei schweren Verletzungen und Operationen mit schweren Vernarbungsprozessen.

Die Therapie kann die Bildung von Anthracocidinen steigern, sie kann sie jedoch bei zu großen Dosen zum Verschwinden bringen. Ebenso scheint das Zusammentreffen von verschiedenen schweren Organerkrankungen zu wirken (*Arndt-Schulz*sches Gesetz ?).

50 Sera töteten Milzbrand- und Typhusbacillen ab.

---

### Literaturverzeichnis.

[1]) *Dresel, E. G.* und *H. Freund*, Studien zur unspezifischen Reiztherapie. 2. Mitt. Über die experimentelle Steigerung der Anthracocidie im Blute. Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. **91**, H. 6. — [2]) *Pfeiler, Otto*, Über den Einfluß intravenöser Proteinkörperzufuhr auf die Bactericidie des Normalserums. Dr. Dissertation. München 1922. R. Oldenbourg.





(Aus dem Pathologischen Institut der Hamburgischen Universität.)

# Über Plaut-Vincentsche Angina.

Von
**Eugen Fraenkel.**

Mit 5 Textabbildungen.

Während wir über die Klinik der sog. Plaut-Vincentschen Angina so gut orientiert sind, daß Meinungsverschiedenheiten kaum bestehen, gilt das gleiche nicht für die pathologische Anatomie des Leidens. Es kann das nicht verwunderlich erscheinen, weil zu anatomischer Untersuchung der dabei erkrankten Organe kaum je Gelegenheit gegeben ist. Gehört es doch zu den allergrößten Seltenheiten, daß die Erkrankung zum Tode führt. Oder, wenn sie es tut, ist der Prozeß so weit vorgeschritten, daß über die ersten, an den Geweben wahrnehmbaren Veränderungen nichts mehr ausgesagt werden kann. So ist es gekommen, daß nur ganz vereinzelte Beobachtungen Gelegenheit boten, sich mit den hier angedeuteten Fragen zu beschäftigen. Sie sind mitgeteilt von *A. Meyer* (Angina ulcero-membranacea und ihre Erreger; Sammlung klinischer Vorträge, Chirurgie Nr. 137/138), von *Eichmeyer* in einem zusammenfassenden Referat über die Angina ulcero-membranacea Plaut und Stomatitis ulcerosa (Lubarsch-Ostertag 1904), von *Groß*, über Angina ulcero-membranacea (Dtsch. Archiv f. klin. Med. **79**, S. 369), sowie von *Benöhr* in der biologischen Abteilung des Hamburger ärztlichen Vereins (Sitzung vom 4. VII. 1905. Münch. med. Wochenschrift S. 2299). Material von tödlich verlaufenen Fällen hat *Eichmeyer* in Händen gehabt. Er untersuchte Stücke von beiden Tonsillen, erwähnt aber leider über das makroskopische Verhalten der Halsorgane nichts. Ein tödlich endender Fall Plaut-Vincentscher Angina ist auch von *M. Mayer* und *Schreyer* beschrieben (Dtsch. med. Wochenschr. Nr. 16. 1905). Der Tod trat aber erst am 23. Krankheitstage ein, so daß die Möglichkeit zu einer Untersuchung der Anfangsstadien nicht gegeben war. Die Autoren führen auch die von anderen beobachteten letal verlaufenen Fälle an. *Eichmeyer* gibt an, daß in der rechten Tonsille sich ein schmaler Saum kern- und strukturlosen Gewebes mit einem zarten Fibrinnetz gegen das gesunde absetzt. In diesem nekrotischen Gewebe liegen, diffus verteilt, mäßig zahlreiche fusiforme Bacillen. In der linken Tonsille ist der Geschwürsgrund



schon makroskopisch durch eine intensivere Färbung von dem übrigen Mandelgewebe abgehoben. Die dunkle Randzone läßt einen dichten Wall massenhaft auftretender Kokken erkennen, der an zahlreichen Stellen durch zapfenartig vordringende Haufen fusiformer Bacillen unterbrochen ist. Das Gewebe des Geschwürsgrundes ist in einer Ausdehnung bis zu mehreren Millimetern kern- und strukturlos. An der Grenze zwischen totem und lebendem Gewebe sieht man an Weigertschnitten einen gefärbten Saum, der sich aus einem überaus zarten Flechtwerk feinster Fibrinfäden mit nur spärlich eingestreuten und teilweise zerfallenen Leukocyten zusammensetzt. Stase und Thrombose des Grenzgebietes charakterisieren die hier bestehende Zirkulationsstörung. Die Bacillen dringen in Haufen und Scharen in das nekrotische Gewebe ein, verteilen sich und durchsetzen die Fibrinschicht, um dann noch in zahlreichen Exemplaren in das lebende und entzündlich infiltrierte Gewebe vorzugehen. Ihre Größe und Form ist charakteristisch. Auffallend erscheint die große Zahl gekörnelter und vakuolisierter Exemplare.

*A. Meyer*, der die Weigertsche Methode als die beste zur Darstellung der fusiformen Bacillen im Gewebe empfiehlt, entwirft von der ulcerierten Partie das folgende histologische Bild. Man kann an ihr — und das entspricht der Schilderung, die *Vincent* auf Grund der Untersuchung abgestoßener Membranen geliefert hat — 3 Schichten unterscheiden. 1. Zu oberst eine nekrotische Pseudomembran mit fehlender oder nur angedeuteter Kernfärbung. Im übrigen sei die Struktur des Gewebes, z. B. durch Eosinfärbung, gut zu erkennen. In dieser Schicht sieht man Bacillen in mäßiger Menge, daneben oberflächlich Spirochäten und öfters verschiedene Kokken und andere Bacillen. Die 2. Schicht zeigt kaum etwas anderes als Bacillen; es ist die Schicht der aktiven Bacillenwucherung. Sie sind meist parallel zueinander und senkrecht zur Grenze des lebenden Gewebes gelagert wie Palisaden (oder einer Phalanx vergleichbar), aber auch einander überkreuzend, oder sich verflechtend. Die 3. Schicht stellt die Zone des lebenden Gewebes dar, ist leicht ödematös und infiltriert mit gelapptkernigen Leukocyten in mäßiger Zahl. Sie enthält Bacillen, die in abnehmender Menge in verschiedener Richtung in das Gewebe eindringen, nicht annähernd so stark wie bei eitrigen Prozessen. Spirillen fand *Meyer* nicht im lebenden Gewebe, sonst aber hat er sie gesehen (bei welcher Färbung gibt er nicht an), und wenn andere sie nicht gefunden haben, so beruhe das auf Mängeln der Methode. Die tiefe Lagerung der Spirochäten entspreche der neuerdings herrschenden Auffassung von ihrer aktiven Beteiligung an dem pathologischen Prozeß.

*Groß*, der ein kammförmig vorspringendes Tonsillarstückchen untersuchen konnte, berichtet, daß das Oberflächenepithel fehlt und durch





Belag ersetzt ist. Dieser zeigt Mischung und Übergänge zwischen Entzündungs- und Nekrosevorgängen. Die ganze Membran ist mit Eiterzellen durchsetzt. Die Nekrose ist am ausgesprochensten an der Oberfläche. An den Stellen mit frischer Nekrose und erhaltener Membranstruktur liegen die Bacillen fast in Reinkultur auch an der Oberfläche, dann den Belag durchsetzend, um in dem angrenzenden Fibrinnetz sich zu sammeln; jenseits davon sind sie nur spärlich. Zwischen den Bacillen sah er auch einzelne Spirillen, hält aber ihre Bedeutung für unsicher, da sie zu spärlich und inkonstant angetroffen wurden. Die Bacillen dringen also in die Tiefe und finden sich auch an der Oberfläche an Stellen mit beginnender Erkrankung. Es liegt also kein sekundäres Eindringen vor.

*Benöhr*, der ein probeexcidiertes Stückchen untersucht hat, fand die oberste Epithelschicht aufgelockert und von Rundzellen durchsetzt. Die Kerne der Epithelzellen i. g. gut erhalten, hin und wieder nekrotisch. In den Lücken zwischen ihnen nur fusiforme Bacillen. Die an der erkrankten Partie vorhandenen Auflagerungen setzen sich fast nur aus Bacillen und spärlichen Spirillen zusammen. An Weigertpräparaten sah er, im Gegensatz zu *Groß* und *Eichmeyer*, kein Fibrin und findet sich in dieser Beziehung in Übereinstimmung mit *A. Meyer*, demzufolge das Fehlen von Fibrin ein Merkmal der fuso-spirillären gegenüber anderen pseudomembranösen Prozessen sei. In einem zweiten, die abgestoßene Uvula darstellenden Objekt fanden sich bei der histologischen Untersuchung zwischen amorphen Detritusmassen fusiforme Bacillen, aber keine Spirillen. Auch hier fehlte Fibrin. Auch *Benöhr* ist der Ansicht, daß sich durch diesen Fibrinmangel die Pseudomembranen der Plaut-Vincentschen Angina von denen der Diphtherie unterschieden.

Eine Arbeit von *Tunnicliff* [The microscop. appearances in ulceromembranous tonsillit. (Vincents angina); Journ. of infections diseases Vol. XXV, p. 1132. 1919] ist mir nur aus einem Referat im Zentralbl. f. Bakt. (Ref.) **71**, S. 691 bekannt geworden. Ich vermag daher nicht zu beurteilen, an was für Objekten die histologische Untersuchung stattgefunden hat. Einspruch muß aber dagegen erhoben werden, daß der Verfasser nur von Vincentscher Angina spricht, da historisch feststeht, daß *Plaut* lange vor *Vincent* auf die in den Belägen bei der in Rede stehenden Krankheit in Symbiose mit Spirillen auftretenden Bacillenspieße aufmerksam gemacht hat. Im übrigen hat *Tunicliff* Bacillen und Spirillen in großer Zahl zwischen dem nekrotischen Epithel und dem lebenden Gewebe beobachtet. Auch in das normale Gewebe seien beträchtliche Mengen vorgedrungen; hier hätten sogar die spirillären Formen vor den bacillären vorgeherrscht. Von Kokken und anderen Bakterien seien die vordringenden Bacillen und Spirillen im Bereich der Nekrose nicht begleitet gewesen.

Selbst auf die Gefahr hin, daß mir der eine oder andere hierhergehörige Fall entgangen ist, darf ich so viel behaupten, daß die Zahl der einschlägigen Beobachtungen eine sehr geringe ist, und daß weitere Beiträge, die sich nicht bloß auf die Untersuchung probeexcidierter Stückchen, sondern auf die Begutachtung von Sektionsmaterial beziehen und die geeignet sind, sowohl über die Art des vorliegenden Prozesses, als auch über das Verhalten der in Betracht kommenden Krankheitserreger Aufschluß zu geben, durchaus erwünscht sind. Von diesem Gesichtspunkt geleitet möchte ich über folgenden, zur Sektion gelangten Fall und die dabei gewonnenen Untersuchungsergebnisse berichten. Und noch aus einem *anderen* Grund. Es fehlt bisher, soweit ich sehe, an Photogrammen, die uns objektiv und wahrheitsgetreu über die Lagerung und Topographie der Krankheitserreger einwandfreien Aufschluß geben. Auch in *dieser* Hinsicht soll die folgende Mitteilung eine bestehende Lücke ausfüllen, wenigstens soweit es sich um die Verbreitung der fusiformen Bacillen handelt.



Abb. 1. Zunge mit Halsorganen bei Plaut-Vincent-Angina.

Die 21jährige Patientin war wegen Syphilis auf der Hautabteilung des Eppendorfer Krankenhauses behandelt und wegen Diphtherie auf die Station des Oberarztes Dr. *Reye* verlegt worden, wo sie bald zugrunde ging. Die Sektion (Nr. 205. 1922) ergab, abgesehen von einer Knochennarbe am Stirnbein und von hämorrhagischen Bronchopneumonien in beiden Unterlappen, den folgenden Befund an den Halsorganen:

Vom Foramen coecum ab nach rückwärts (Abb. 1) finden sich am *Zungengrund* deutlich prominierende, gelbliche, weiche runde Flecke, deren Kuppe an einzelnen etwas eingesunken ist. Die Erkrankung ist ausgesprochen am *lymphatischen Apparat* lokalisiert. Die linke *Tonsille* und die *laryngeale Seite der verdickten Epiglottis*, sowie deren stark abgerundete Ränder, besonders der rechte, sind von einer gleichmäßig schmierigen, gelben, festhaftenden Schicht überzogen. An der Vorderfläche des Kehldeckels erkennt man deutlich die Entstehung dieser anscheinend zusammenhängenden Masse aus einzelnen Herden. Auch auf der Schleimhaut der ödematösen *Rachenwand* sitzen die gleichen

Herde wie am Zungengrund, hier bis linsengroß, zum Teil in Gruppen zusammenstehend und leicht konfluierend. Desgleichen sind die *ary-epiglottischen Falten* ödematös und von einzelnen gelben Herdchen eingenommen, ebenso die Schleimhaut über der Spitze der *Gießbeckenknorpel* und in der *Incisura interarytaen*. Selbst die *Recess. piriform.* sind nicht frei; links sitzt am Eingang eine Gruppe konfluierter Herde, an der tiefsten Stelle noch 2 linsengroße, rechts eine kleine Zahl in der Mitte des Recessus. Am *Zungenkörper* finden sich, bei Freibleiben der vorderen Hälfte, einzelne, kaum über stecknadelkopfgroße Herdchen von übrigens der gleichen Beschaffenheit.



Abb. 2. Übersichtspräparat: isolierter Nekroseherd der Zunge.

In dem vom Mandelbelag sofort angefertigten, gefärbten *Ausstrichpräparat* wurden, neben verschiedenen anderen Bakterien, *Spirillen und fusiforme Bacillen* nachgewiesen. Zur *histologischen Untersuchung* wurde je ein Herd von der hinteren Rachenwand und vom Zungenkörper verwendet und dabei folgendes festgestellt:

Man sieht am Übergang der normalen Schleimhaut in den Krankheitsherd (Abb. 2) die bis dahin gut gefärbten, fest zusammengelagerten Epithelien den Zusammenhang untereinander und mit der Unterlage verlieren, sie erscheinen auch blasser tingiert, um über der erkrankten Stelle selbst überhaupt keine Farbe mehr anzunehmen. *Dem Herd*

*entsprechend ist das Gewebe, annähernd keilförmig in die Tiefe greifend, völlig nekrotisch*, wobei die Keilbasis der Zungenoberfläche entspricht. Zwischen den locker miteinander verbundenen Epithelien sieht man, fischzugartig und parallel der Oberfläche angeordnet, fusiforme Stäbchen, an den Rändern des Herdes deren Verlaufsrichtung folgend. Über die Art der Verbreitung der *Bakterien* geben bei weitem am besten nach der Weigertschen Fibrinmethode behandelte Schnitte Aufschluß. Schon bei Betrachtung mit schwacher Vergrößerung erkennt man, daß, gegenüber *dem zusammenhängenden Rasen*, in dem sie *an der Oberfläche*, soweit ein Urteil in dieser Beziehung überhaupt möglich ist, anscheinend in Reinkultur, angetroffen werden, sich in *den tieferen Schichten*, als dunkelblaue Flecke und Streifen imponierende, Massen vorfinden, die dichten Ansammlungen der fusiformen Bacillen entsprechen (Abb. 3 u. 4). Sie erscheinen hier zum Teil als *reiserartige Bündel oder lockeres Buschwerk*. Aber auch das bei schwacher Vergrößerung *scheinbar bacillenfreie Gewebe* ist *diffus durchsetzt von einzelnen Bacillenindividuen*. In diesem Bereich lassen sich in dem nekrotischen Gewebe massenhaft zellige Elemente nachweisen, die ihre Struktur nahezu völlig eingebüßt haben, aber wenigstens stellenweise sich noch als Rundzellen mit stark verwaschenem großem Kern erkennen lassen. Diese Zellen sind dann an den meisten Stellen zusammengesintert und stellen so die Hauptmasse des als nekrotischer Keil imponierenden Gewebes dar. Erst in den tiefsten Schichten des Krankheitsherdes, am Übergang in die Umgebung, werden die Zellkonturen wieder deutlich, man kann sich hier davon überzeugen, daß es sich um ziemlich große, einkernige, in ein retikuläres Gewebes eingebettete Lymphocyten, vielleicht auch Plasmazellen entsprechende Elemente handelt. Gelapptkernigen Leukocyten bin ich nicht begegnet. An der im Schnitt getroffenen quergestreiften Muskulatur lassen sich Veränderungen nicht feststellen, während sich das intermuskuläre Gewebe durch einen gewissen Reichtum an geschwollenen Bindegewebszellen auszeichnet. Was die *Gestalt der Bacillen* anbelangt, so tritt ihre *Spießform* im Gewebe selbstverständlich *nicht so deutlich* zutage, *wie im Ausstrichpräparat*, aber hier und da konnte man doch an einzelnen in ganzer Länge getroffenen Exemplaren ihre spindelige Gestalt erkennen. *Vielfach* sind sie aber *verbogen* oder *gewellt*, ja bisweilen auch *geschlängelt* (Abb. 5), sich in dieser Gestalt dem Gewebe, in das sie eingebettet sind, anpassend. Fibrinöse Beimengungen habe ich im Bereich des Nekroseherdes nirgends gesehen, auch nicht in der angrenzenden gesunden Schicht, in der man nur in einzelnen, hier verlaufenden Gefäßen, diese übrigens nicht völlig verstopfend, fädige Fibrinmassen feststellen konnte.

Wenn ich zunächst mit ein paar Worten auf den *makroskopischen Befund* eingehe, so hat uns dieser darüber belehrt, daß der *Krankheits-*



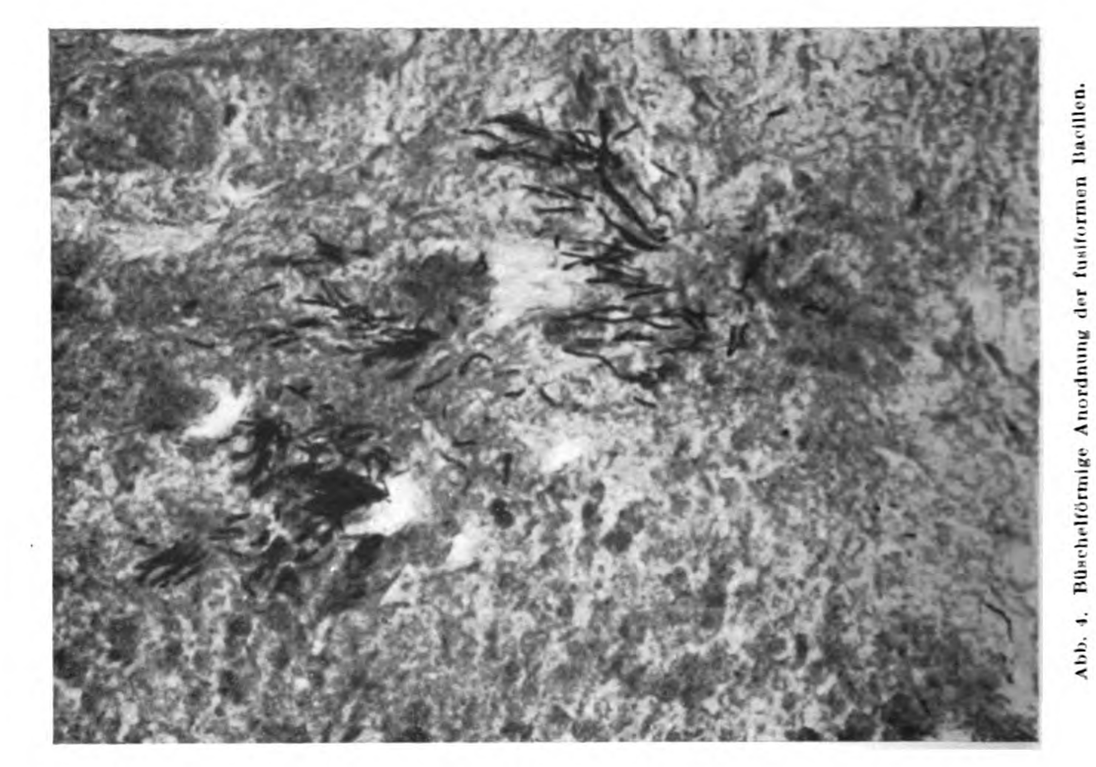


Abb. 4. Büschelförmige Anordnung der fusiformen Bacillen.

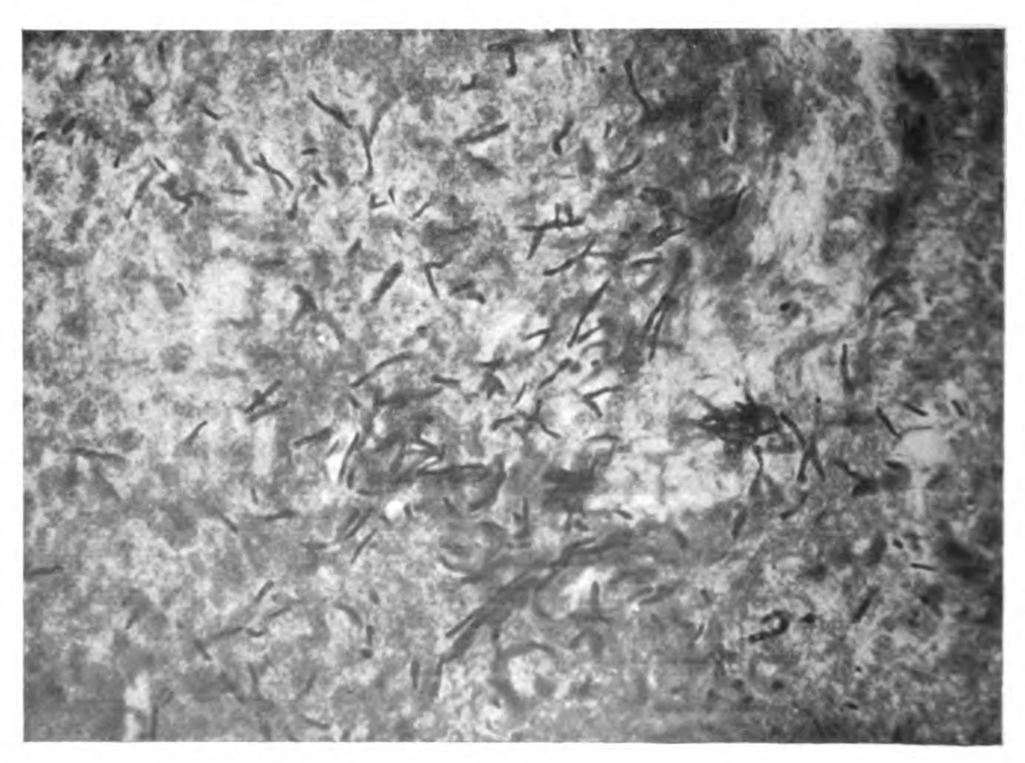


Abb. 3. Diffuse, ziemlich dichte Lagerung der fusiformen Bacillen.

*prozeß* im vorliegenden Fall eine *etwas ungewöhnliche Ausbreitung* insofern erreicht hat, als er, was freilich bekannt, aber doch immerhin als selten anzusehen ist, *auch den Kehlkopf ergriffen* hat und weiter an Stellen angetroffen wurde, deren Sitz bisher nicht erwähnt worden ist, nämlich in den *Recess. piriform.* Trotzdem möchte ich glauben, daß er dort vielleicht häufiger lokalisiert ist und nur deswegen nicht festgestellt wird, weil sich diese Teile bei der gewöhnlichen Art der Schlunduntersuchung der direkten Wahrnehmung entziehen. Und ferner haben wir aus der makroskopischen Betrachtung des Präparates erfahren,

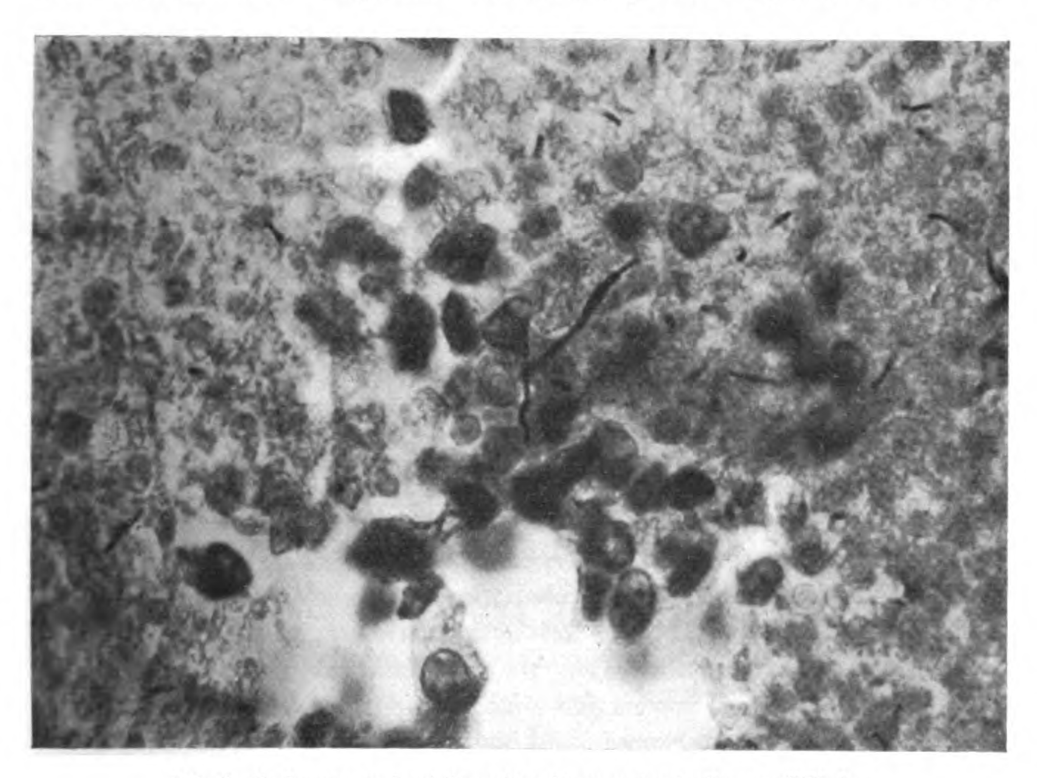


Abb. 5. Verbogene und spirillenartige Formen der fusiformen Stäbchen.

daß die *Erkrankung in Form diskreter Herde* auftritt, die sich *erst durch Konfluenz* zu den *mehr flächenhaften Pseudomembranen* vereinigen, wie wir sie bei der voll entwickelten Erkrankung gewohnt sind. Solange die Herdchen so klein sind, machen sie sich für den Träger vermutlich überhaupt nicht bemerkbar und verraten sich auch der Umgebung der Kranken nicht durch den später so ausgesprochenen, für das Leiden bis zu einem gewissen Grade charakteristischen Foetor; so dürfte es kommen, daß die Patienten, erst wenn die Erkrankung ein gewisses Höhestadium erreicht hat, den Arzt aufsuchen, und dieser dann das bekannte Bild der Rachenorgane zu sehen bekommt. Gerade die Inspektion des Kehldeckels im vorliegenden Fall, dessen orale Seite von

einem dicken, zusammenhängenden Belag eingenommen erschien, ließ an der laryngealen Fläche die Zusammensetzung aus distinkten Herden erkennen. Auch auf die *Bevorzugung des lymphatischen Apparats* möchte ich nicht unterlassen hinzuweisen. Freilich sprach für eine solche die von der Klinik her bekannte Lokalisation an den Tonsillen. An unserem Präparat hat sich als *Ausdruck dieser Elektivität der Sitz der Herde am Zungengrund* und an der *hinteren Rachenwand* erwiesen. Trotz der das Durchschnittsmaß überschreitenden Ausdehnung der Erkrankung kommt diese als Todesursache für unseren Fall kaum in Betracht; die durch ihre Syphilis und die dadurch notwendig gewordenen therapeutischen Maßnahmen in ihrer Widerstandsfähigkeit geschwächte Patientin ist vielmehr im wesentlichen den bei der Sektion festgestellten Bronchopneumonien erlegen.

Die Schlundaffektion hat bei ihrem erst kurzen Bestand die durch sie gesetzten geweblichen Veränderungen in einem außerordentlich frühen Stadium und deshalb frei von sekundären, komplizierenden, bei nekrotisierenden Prozessen der Mundhöhle so leicht eine Rolle spielenden Vorgängen vor Augen geführt.

Das Mikroskop hat einwandfrei gezeigt, daß an den Stellen der Erkrankung das *Gewebe einfach abgetötet* wird. Von einer Gliederung der dem Tode verfallenen Gewebsbezirke in verschiedene Zonen, wie sie von einem Teil der Autoren bei ihren histologischen Schilderungen angegeben wird, konnte ich mich an dem von mir zur Untersuchung verwandten Material nicht überzeugen. Die *Nekrose* erscheint vielmehr *ganz gleichmäßig im ganzen Bereich des Krankheitsherdes*, ebensowohl das eigentliche Schleimhautgewebe, wie die dieses durchsetzenden Zellen betreffend. Bezüglich der letzteren erwähnte ich bereits, daß ich allenthalben nur einkernige, lymphocytären Charakter aufweisende Zellen gesehen habe. *Nirgends fand ich Fibrin im Bereich der Nekrosen* und kann hinsichtlich dieses Punktes die Angaben von *A. Meyer* bestätigen. Aber es sind hierüber noch weitere Untersuchungen erforderlich, ehe man sich zu dem apodiktischen Ausspruch dieses Autors bekennen sollte, daß das Fehlen von Fibrin ein Merkmal der fusospirillären gegenüber anderen pseudomembranösen Prozessen sei. Kennen wir doch auch jetzt schon nekrotisierende Entzündungen an den Schlundgebilden, bei denen die einfache Gewebsabtötung das Wesentliche ist, ich meine die durch Streptokokken hervorgerufenen Prozesse, wie wir sie vor allem beim Scharlach, aber auch, unabhängig von diesem, als genuine nekrotisierende Angina bei Kindern, wie bei Erwachsenen, beobachten, bei denen eine fusospirilläre Wirkung nicht in Betracht kommt und bei denen eine fibrinöse Exsudation im Gewebe überhaupt nicht, oder nur verschwindend, beobachtet wird. Ist es doch eine uns seit Einsetzen der bakteriologischen Forschung geläufige Tatsache, daß

verschiedene Krankheitserreger die gleichen anatomischen Veränderungen hervorzurufen imstande sind. Wenigstens im Prinzip. Das gilt auch für die hier als Beispiel herangezogenen Erkrankungen, wenn auch zwischen ihnen und der Plaut-Vincentschen Angina schon makroskopisch erkennbare Unterschiede bestehen, insofern bei dieser die Gewebsabtötung von vornherein eine vie tiefergreifende, massivere erscheint, als bei den durch Streptokokken veranlaßten nekrotisierenden Schlunderkrankungen. Das abgetötete Gewebe imponiert auch mehr als weiche pulpöse Masse gegenüber den mehr trockenen und festeren Schorfen bei Streptokokkenanginen. Im weiteren Verlauf kann es dann wieder zu einem mehr übereinstimmenden Aussehen der erkrankten Organe bei beiden Krankheitsprozessen kommen, wenn, nach Abstoßung der verschorften Teile, Geschwürsbildung und schließlich Reinigung der gesetzten Substanzverluste eingetreten ist. Daß auch *sonst wesentliche Differenzen zwischen den beiden hier in Parallele gestellten, ihrer Ätiologie nach durchaus verschiedenen Erkrankungen* bestehen, so *hinsichtlich des Bestehens der regionären Lymphdrüsen*, so betreffs der *Rückwirkung auf den Gesamtorganismus*, will ich hier nur streifen. Das darf aber nicht hindern, mit Nachdruck zu betonen, daß *der anatomische Charakter der Erkrankung bei beiden der des Gewebstodes* ist. Wenn dem aber so ist, dann wirft sich die Frage auf, ob es denn berechtigt ist, bei der Plaut-Vincentschen Erkrankung von einer ulcero-membranösen Angina zu sprechen. Diese Frage ist m. E. unbedingt zu verneinen. Ich würde es für viel zutreffender halten auch *die Plaut-Vincentsche Angina als eine nekrotisierende fuso-spirilläre* zu bezeichnen und sie *der nekrotisierenden Streptokokkenangina gegenüberzustellen*. Damit würde sowohl die Art des beiden zugrunde liegenden pathologischen Vorgangs, als auch der sie auslösenden Krankheitserreger klar zum Ausdruck gebracht.

Was nun die letzteren anlangt, so haben die von mir angestellten Untersuchungen über die *pathogene Rolle der fusiformen Bacillen wohl keinen Zweifel* gelassen, denn sie finden sich in dem erkrankten Gewebe bis hart an die gesunde Umgebung *ohne Beimengung anderer Mikroorganismen*. *Friedberger* und *Pfeiffer* äußern sich in dem von ihnen herausgegebenen „Lehrbuch der Mikrobiologie“ S. 979/80, 1919 über diesen Punkt wie folgt: „Die ätiologische Rolle der Spirochäten für die Pathogenese der Plaut-Vincentschen Angina wird durch die chemotherapeutische Beeinflussung des Prozesses durch Salvarsan höchst wahrscheinlich gemacht, während die Frage nach der ursächlichen Bedeutung der spindelförmigen Bacillen noch als offen gehalten werden muß.“ Demgegenüber möchte ich behaupten, daß die über das Vordringen der Bacillenspieße in dem nekrotischen Gewebe übereinstimmend gemachten Angaben von *Eichmeyer*, *A. Meyer*, *Groß* und von



mir kaum eine andere Deutung zulassen dürften, als *daß diese Bacillen bei der Entstehung des Leidens eine wesentliche aktive Rolle* spielen. Über die Lagerung der Bacillen in den einzelnen Schichten des abgestorbenen Gewebes habe ich mich eingehend geäußert, und besser als jede Beschreibung geben die beigefügten Photogramme, an denen die zu kräftigen Büscheln vereinigten, vielfach gewellten, bisweilen gekörnelten Bacillen kenntlich sind, über alle Einzelheiten Aufschluß. Auch an Methylenblauschnitten konnte man sich überzeugen, daß andere bakterielle Beimengungen fehlten. Dadurch wird der Weigertpräparaten gegenüber zu erhebende Einwand, daß bei dieser bis zu einem gewissen Grade elektiven Färbung nicht alle Bakterien zur Anschauung gebracht sein könnten, ohne weiters hinfällig.

Eine andere Frage ist ja die, *welcher Anteil kommt den Spirillen* bei der Plaut-Vincentschen Angina zu? In dieser Beziehung gehen die Ansichten auseinander; die *Pfeiffer-Friedberg*sche habe ich eben angeführt. *A. Meyer* hat die Spirillen, wenn auch nicht in das lebende Gewebe vordringend, so doch in den tieferen Gewebslagen gesehen, was seiner Meinung nach der neuerdings herrschenden Ansicht von ihrer aktiven Beteiligung an dem pathologischen Prozeß entspräche. *Groß* hat zwar auch einzelne Spirillen zwischen den Bacillen gefunden, hält aber ihre Bedeutung wegen der Spärlichkeit und Inkonstanz des Vorkommens für unsicher. Nach *Tunnicliff* hätten sogar die spirillären Formen in dem normalen Gewebe über die bacillären prävalirt. Ich kann zu der Frage auf Grund eigener Befunde leider nicht Stellung nehmen, weil es mir bei den angewandten Färbungsmethoden nicht gelungen ist, Spirillen im Gewebe mit Sicherheit zu erkennen. Ich möchte mich deshalb, lediglich gestützt auf die Ergebnisse anderer Untersucher, hierüber wie folgt äußern. Es dürfte nach den bisherigen Schilderungen, die freilich einer Ergänzung durch überzeugende Photogramme dringend bedürfen, nicht zweifelhaft sein, daß *auch Spirillen ins Gewebe vordringen und gemeinsam mit den gleichfalls im Gewebe angesiedelten fusiformen Bacillen ihr Zerstörungswerk* vollbringen. Welchem von den beiden Krankheitserregern dabei die Hauptrolle zufällt, ist schwer zu entscheiden. Es scheint mir aber mit Rücksicht auf die bei der Salvarsanbehandlung des Leidens, der rein örtlichen wie der allgemeinen, gemachten Erfahrungen berechtigt, sich vorzustellen, daß *wenn durch dieses spirillocide Mittel die Spirillen vernichtet werden, auch die fusiformen Bacillen die Fähigkeit verlieren, das Gewebe noch weiter zu schädigen*, entweder *weil auch sie dann dem Untergang geweiht sind, oder, ohne zugrunde zu gehen, als harmlose Saprophyten im Gewebe liegen bleiben.*

Daß aber die fusiformen Stäbchen tatsächlich pathogene Bedeutung besitzen, scheint mir auch ein von *Larson* und *Barron* mitgeteilter Fall



zu beweisen [Report of a case, in which the fusiform bacillus was isolated from the bloodstream; Journal of infections diseases XIII, p. 429. 1913, referiert im Zentralbl. f. Bakteriol. (Ref.) LXI, p. 606], bei dem es gelang, 2 Tage vor dem Tode des an schwerer Plaut-Vincentscher Angina erkrankt gewesenen 37jährigen Mannes, aus dem Blut fusiforme Bacillen zu züchten. Die Richtigkeit dieses bis jetzt meines Wissens isoliert gebliebenen Befundes vorausgesetzt, so würde dadurch, mehr noch als durch den histologischen Nachweis der fusiformen Bacillen in den tiefen Lagen der Krankheitsherde, ihre Rolle als aktive Krankheitserreger bei der Plaut-Vincentschen Angina einwandfrei bewiesen sein. Ob die Spirillen als Schrittmacher für die fusiformen Bakterien anzusehen sind, wie es besonders nach den Untersuchungen von *Martin Mayer* und *Keysselitz* beim Ulcus tropicum (Arch. f. Schiffs- und Tropenhyg. XIII, S. 137ff.) der Fall zu sein scheint, ist auf Grund der bis jetzt über die Plaut-Vincentsche Angina bekanntgewordenen histologischen Befunde einstweilen nicht zu entscheiden. Der Wert meiner vorstehend gemachten Mitteilungen dürfte u. a. darin zu erblicken sein, daß sie sich auf ein Stadium der Erkrankung beziehen, in dem es noch nicht zum Gewebszerfall gekommen und somit die Möglichkeit des sekundären Eindringens von bakteriellen Bewohnern der Mundhöhle, wie es bei geschwürigen Prozessen derselben so häufig vorkommt, ausgeschlossen war.

(Aus dem Institut für Infektionskrankheiten „Robert Koch". [Serologische Abteilung: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. *R. Otto*.])

# Beiträge zur Weil-Felixschen Reaktion.

Von
**R. Otto** und **C. C. Chou** (Shanghai).

Mit 8 Abbildungen.

Der von *Weil* und *Felix* (Wien. klin. Wochenschr. 1920) erhobene Befund, daß das Serum der mit dem Gehirn fleckfieberinfizierter Meerschweinchen vorbehandelten Kaninchen auch den X 19-Bacillus spezifisch agglutiniert (also eine positive Weil-Felixsche Reaktion gibt), ist im Prinzip von verschiedenen Seiten, so von *Kuczynski* und *Wolff* (Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh. Abt. I, **85**, Orig. Beiheft), *Friedberger* und *Schiff* (Berl. klin. Wochenschr. 1921) und *Otto* und *Winkler* (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **93**) sowie neuerdings durch *Kraus* und *de la Barrera* (Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. Orig. **34**) bestätigt worden. Allerdings konnten *Kraus* und *Barrera* im Widerspruch mit den Angaben von *Weil* und *Felix* nicht bei allen mit Gehirnemulsionen vorbehandelten Kaninchen, sondern nur in Ausnahmefällen positive Befunde erheben; auch waren die von ihnen ermittelten Agglutinationswerte sehr niedrige. Es ergaben sich ferner in den positiven Fällen Differenzen bei Benutzung lebender Kultur und des 80°-Diagnosticums. Auch *Otto* und *Winkler* haben den Nachweis von Agglutininen bei den Kaninchen nicht regelmäßig erbringen können. Er blieb z. B. nach der Vorbehandlung der Tiere mit dem Fleckfieber-Virusstamm „Reinickendorf" aus, während er mit den Virusstämmen „Salzwedel I" und „Salzwedel II" in allen Fällen gelang. Da nun *Dörr* und *Pick* (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **89**) sich auch nicht von dem Auftreten höherer Agglutinationswerte bei den Kaninchen nach Vorbehandlung mit Fleckfiebervirus hatten überzeugen können und ferner *Ruß* und *Kirschner* (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **92**) negative Resultate erhalten hatten, so nahmen *Otto* und *Winkler* an, daß gewisse Fleckfiebervirusstämme sich (vielleicht durch die lange Meerschweinchenpassage) so abgeschwächt haben dürften, daß sie für Kaninchen nicht mehr antigen wirkten. Allerdings hatten *Otto* und *Winkler* bei ihren Agglutinatinsversuchen nur mit H-Formen des X 19-Bacillus arbeiten können. Eine ihnen damals von anderer Seite



überlassene O-Form ging sehr bald in die H-Form zurück. Sie ergab zwar anfangs etwas höhere Agglutinationswerte als die H-Form, wurde aber bald nicht stärker beeinflußt als die letztere. Es schien uns daher nicht ausgeschlossen, daß wir mit einer beständigeren O-Form bessere Resultate erzielen würden. Auf unsere Bitte übersandte uns der inzwischen leider verstorbene, um die Fleckfieberforschung so hoch verdiente *E. Weil* eine O-Form seines X 19-Stammes. Zu Wiederholungen der Versuche von *Otto* und *Winkler* wurden wir um so mehr veranlaßt, als *Weil*, dem wir auf Wunsch unseren Stamm „Reinickendorf" überlassen hatten, auch nach Vorbehandlung mit diesem Stamm positive Weil-Felixreaktionen bei Kaninchen erhalten hatte (briefliche Mitteilung). Über das gleiche Resultat hatte auch *Kuczynski* (Berl. klin. Wochenschr. 1921) berichtet, doch fehlen nähere Angaben über die Höhe des Titers. Seine Versuchsergebnisse lassen sich im übrigen mit unseren nicht so ohne weiteres vergleichen, da unser Stamm zwar im Ursprung mit dem von *Kuczynski* identisch ist, aber bereits vor Jahresfrist von ihm abgetrennt wurde.

Als wir nun zunächst in derselben Weise wie *Otto* und *Winkler* vorgingen (indem wir die Kaninchen intraperitoneal vorbehandelten und den Ausfall der Reaktion nach 2stündigem Aufenthalt der Versuchsröhrchen bei 37° C ablasen), erhielten wir auch mit der O-Form von *Weil* keine nennenswerten Titerhöhen, wenngleich ein geringer Anstieg des Titers wohl vorhanden war. Wir gingen daher — nach dem Vorgange *Weils* — dazu über, die Reaktion erst nach 22—24 Stunden abzulesen. Für die Praxis beim Menschen hatten wir diese lange Beobachtungszeit früher abgelehnt, weil sich bei den Untersuchungen von *Dietrich* im hiesigen Laboratorium (Dtsch. med. Wochenschr. 1916) ergeben hatte, daß nach 24stündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur auch vereinzelte Kontrollsera bis 1 : 50 bzw. 1 : 100 positiv reagierten. Neuere Untersuchungen mit der O-Form von *Weil* haben uns gezeigt, daß bei der Prüfung der Kaninchensera die Gefahr unspezifischer Reaktionen selbst bei 22 stündigem Stehenlassen der Versuchsröhrchen (2 Stunden bei 37° und 20 Stunden bei Zimmertemperatur) nicht besteht. Normale Kaninchensera agglutinierten die O-Form nie höher als 1 : 5 bzw. 1 : 10.

Nach diesen Vorversuchen mit normalen Kaninchenseren sind wir dazu übergegangen, die Resultate, auch bei den mit Gehirnemulsion vorbehandelten Tieren erst nach 22 Stunden abzulesen. Darnach erhielten wir bei allen Kaninchen, die mit dem Virusstamm „Reinickendorf" (Gehirnemulsion von infizierten Meerschweinchen) vorbehandelt waren, regelmäßig deutliche Agglutinationswerte für die X 19-Bacillen, und zwar sowohl für die H-Form als auch für die O-Form. Bei der ersteren zeigten sich allerdings wieder mehrfach stärkere Schwankungen,

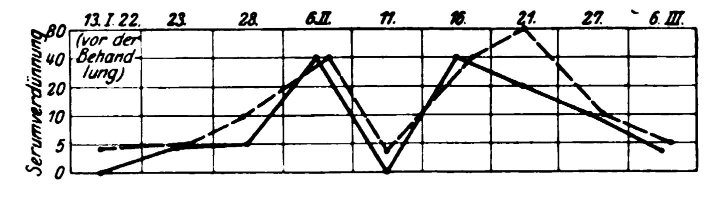


die auf der wechselnden Agglutinabilität der H-Form beruhen dürften. Die deutlichsten Anstiege erhielten wir bei der intravenösen Vorbehandlung der Kaninchen. In diesen Fällen traten die Agglutinine, speziell für die O-Form, auch schon nach erheblich kürzerer Zeit auf. Während der höchste Titer bei der intraperitonealen Vorbehandlung für die O-Form meist nach 24—39 Tagen erreicht wurde, zeigten die Sera der intravenös behandelten Tiere bereits mit 12—17 Tage die höchsten Agglutinationswerte. Für die H-Form war der Anstieg des Titers nach der intravenösen Injektion der Gehirnemulsion zeitlich schwankend.

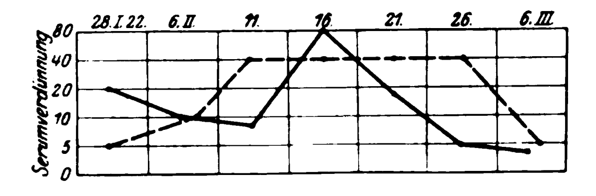
*Wir konnten also in Übereinstimmung mit den obenerwähnten Angaben Weils feststellen, daß sich auch in dem Serum der mit unserem Stamm „Reinickendorf", den Weil in seinem sonstigen Verhalten als „typisch und rein" bezeichnete, Agglutinine gegen den X 19-Stamm nachweisen lassen.* Die früheren negativen Resultate bei 2stündiger Reaktion weisen indessen daraufhin, daß die Agglutinationsbildung in geringerer Stärke erfolgt als nach der Behandlung mit den Virusstämmen „Salzwedel I" und „Salzwedel II". Die von *Otto* und *Winkler* angenommene geringere antigene Wirksamkeit des Virus „Reinickendorf" dürfte somit doch vorliegen; damit würde auch die geringere Virulenz des Stammes im Einklang stehen; bei ihm gehören tödlich verlaufende Infektionen bei Meerschweinchen (falls keine Komplikationen eintreten) zu den allerseltensten Ausnahmen, während sie bei den Stämmen „Salzwedel I" und „Salzwedel II" in einem gewissen Prozentsatz vorkamen.

*Es zeigte sich ferner aus unseren Versuchen, daß die Weil-Felixsche Reaktion nach 2 Stunden noch nicht abgeschlossen zu sein braucht, daß jedenfalls bei Tierversuchen die spätere Ablesung (nach 22 Stunden) erforderlich ist.*

Wir glauben, daß sich, durch die Art der Ablesung einerseits und durch die verschiedene Agglutinabilität der einzelnen Stämme und Formen des Proteus X 19 andererseits, auch die oben erwähnten, voneinander so erheblich abweichenden Befunde der verschiedenen Autoren erklären lassen.

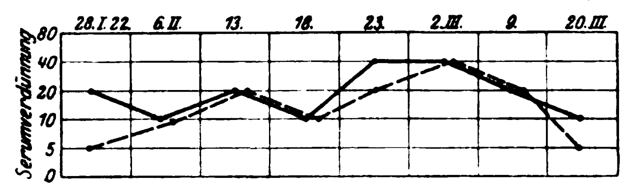



**Kurve 1. Kaninchen 4. Behandlung 13. I. 1922 3,0 ccm Fleckfieber-Gehirnemulsion 1/10 intraperitoneal.**

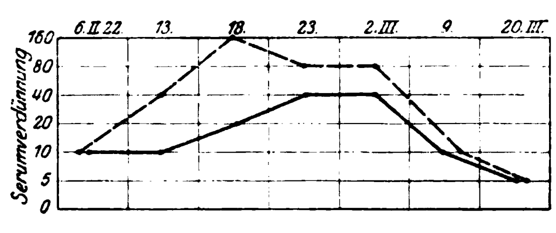



**Kurve 2. Kaninchen 214. Behandlung 28. I. 1922: 8,0 ccm Fleckfieber-Gehirnemulsion 1/10 intraperitoneal.**

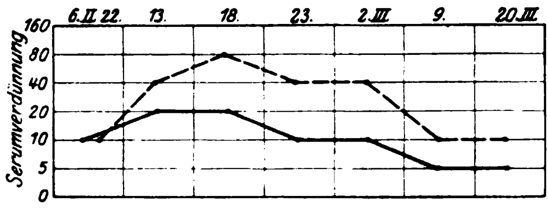
Kurve 3. Kaninchen 215. Behandlung 28. I. 1922: 8,0 ccm Fleckfieber-Gehirnemulsion $^1/_{15}$ intraperitoneal.




Kurve 4. Kaninchen 110. Behandlung 6. II. 1922: 1,0 ccm Fleckfieber-Gehirnemulsion $^1/_{15}$ intravenös.



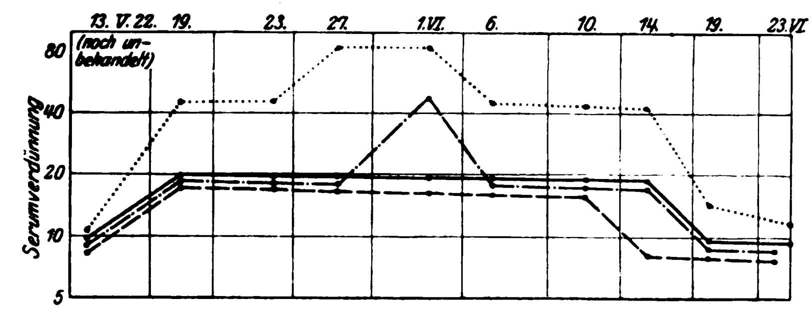

Kurve 5. Kaninchen 438. Behandlung 6. II. 1922: 1,0 ccm Fleckfieber-Gehirnemulsion $^1/_{15}$ intravenös.

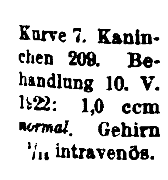


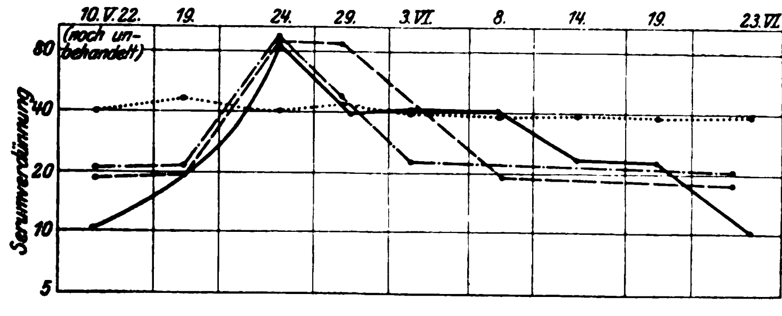

Zeichenerklärung für Kurve 1—5:
- - - - O-Form } Proteus X 19.
——— H-Form

Kurve 6. Kaninchen 79. Behandlung 13. V. 1922: 1,0 ccm Fleckfieber-Gehirnemulsion $^1/_{15}$ intravenös.

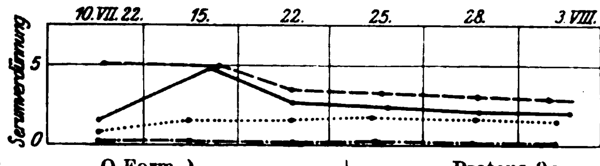
NB. Die Stärke d. Agglutination bei dem angegebenen Titer ist in folgender Weise zum Ausdruck gebracht: Steht der betr. Punkt auf der Abszisse, so soll das bedeuten: die Flockung war deutlich (+); ist er etwas darübergesetzt, so war die Agglutination stark (+ +); etwas unter der Abszisse stehender Punkt besagt: schwache Flockung (±).

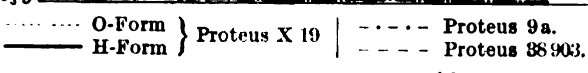




Kurve 7. Kaninchen 209. Behandlung 10. V. 1922: 1,0 ccm normal. Gehirn $^1/_{15}$ intravenös.




Kurve 8. Kaninchen 3169. Behandlung 10. VII. 1922; 1,0 ccm normal. Gehirn $^1/_{15}$ intravenös.



Zeichenerklärung für Kurve 6—8: ········ O-Form } Proteus X 19 | - · - · - Proteus 9a.
——— H-Form | - - - - Proteus 88903.

Unser Befund an Kaninchen gab uns Veranlassung, auch bei menschlichen Fleckfieberseren den Ausfall der Weil-Felixreaktion nach 22-stündiger Reaktionsdauer (2 Stunden bei 37° und nach 20 Stunden bei Zimmertemperatur) nochmals zu vergleichen. Ehe wir auf diese Versuche eingehen, möchten wir kurz auf einige Eigentümlichkeiten unserer Kaninchenkurven hinweisen, die ein gewisses Interesse beanspruchen.

Aus den Kurven geht zunächst hervor, daß nach 22stündigem Ablesen der Titer für die H- und die O-Form nicht immer parallel verläuft. Der Unterschied in der Titerhöhe war besonders deutlich, wenn die Vorbehandlung intravenös geschah (Kurve 4, 5, 6). Bemerkenswert ist ferner, daß das Serum des Kaninchens 79 nach der Immunisierung mit Fleckfiebergehirnemulsion auch einen leichten Anstieg der Agglutinine für die unspezifischen Stämme P 9 und P 38903 zeigte. *Weil* hatte bei seinen Tieren einen solchen nicht beobachtet (briefliche Mitteilung).

Die Agglutininkurve des Kaninchens 4 ist insofern bemerkenswert, als sie einen doppelten Gipfel zeigt:

a) erster Anstieg nach 24 Tagen, dann ein Absinken der Agglutinationswerte und dann

b) ein erneuter Anstieg der Agglutinine nach 34 bzw. 39 Tagen.

Schon bei früheren Versuchen hatten die Sera einiger Kaninchen nach dem ersten Anstieg ein vorübergehendes Absinken der Agglutinine gezeigt, dem bei der Untersuchung der nächsten Blutprobe ein erneuter Anstieg folgte. Diese Befunde sind damals von uns nicht näher erwähnt worden, da wir bei den H-Formen öfters Schwankungen in der Agglutinabilität der Kulturen beobachteten. Nach unseren erneuten Befunden möchten wir diese Erscheinung doch nicht allein auf die Kultur zurückführen, da sich die wechselnde Höhe des Titers auch bei den Agglutinationen mit der O-Form von *Weil* zeigte. Dazu kommt, daß neuerdings *Berger* (Klin. Wochenschr. 1922) bei Kaninchen, die mit heterologem Blutserum vorbehandelt waren, auch 2 Perioden der Hyperproteinämie feststellen konnte. Letzten Endes beruht ja auch die Weil-Felixreaktion zweifellos auf einer pathologischen Veränderung des Serumproteins. Da wir nun auch in *einem* Falle bei einem mit normalem Gehirn von Meerschweinchen vorbehandelten Kaninchen eine frühzeitige unspezifische Steigerung der Agglutinine (für die H-Form des X 19-Bacillus und die unspezifischen Proteusstämme 9 und 38 903) sahen, so wäre es wohl denkbar, daß in gewissen Fällen auf eine voraufgehende (mehr unspezifische) Steigerung der Agglutinine später erst die zweite (mehr spezifische für die O-Form) folgte. Bei anderen Kontrolltieren wurde übrigens diese Steigerung des Titers nicht beobachtet. Auf eine nähere Diskussion wollen wir hier bei der Spärlichkeit unseres bisher vorliegenden Materials nicht eingehen, sondern diese Beobachtung nur



registrieren. Aus unseren Versuchen ergibt sich indessen, *daß für die Ausführung der Weil-Felixreaktion bei Kaninchen die O-Form den Vorzug verdient.*

*Was nun den Ausfall der Weil-Felixreaktion beim fleckfieberkranken Menschen* betrifft, so ergab die Ablesung nach 22 Stunden (die Röhrchen wurden während dieser Zeit 2 Stunden bei 37° und 20 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten) *für die Praxis* im allgemeinen keine besseren Resultate. Geprüft wurden von uns eine Anzahl Sera, welche wir zu Testzwecken schon längere Zeit aufbewahrt hatten, sowie einige frische Sera. In allen Fällen, wo nach 22 Stunden die Agglutination positiv war, fanden sich auch schon nach 2 Stunden bei 37° mehr oder weniger deutliche Reaktionen, wenngleich der Titer nach 22 Stunden mehrfach höher und die Flockenbildung bei den schwachen Verdünnungen (1 : 50 bis 1 : 200) kräftiger war. Aber auch die Titer bei Seren von nichtfleckfieberkranken Personen stiegen nach 22 Stunden stärker an, so daß man dementsprechend bei der Bewertung des Titers 1 : 100 als „positiver Weil-Felix" vorsichtig sein muß. Aus diesen Gründen würden wir also für die Praxis die alte Ablesung nach 2 Stunden noch weiter empfehlen können. Eine andere Beobachtung gibt uns aber Veranlassung, vorzuschlagen, neben der Agglutination mit frischen lebenden X-Bacillen noch diejenige mit einem Diagnosticum vorzunehmen, und zwar möchten wir auf Grund unserer Erfahrungen das mit Alkohol hergestellte Diagnosticum von *Bien* und *Sontag* empfehlen (vgl. Münchn. med. Wochenschr. 1917, Nr. 43 und Wien. klin. Wochenschr. 1919, Nr. 5). Bei diesem leicht herzustellenden Diagnosticum verläuft (wie bei allen abgetöteten X-Kulturen) die Agglutination bekanntlich langsamer und es kann daher die Reaktion nach 2 Stunden noch negativ sein, während frische Kulturen zu dieser Zeit schon ein positives Resultat geben. Nach 22 Stunden ergab das *Bien*sche Diagnosticum aber regelmäßig positive Resultate in den Fällen, wo die Weil-Felixreaktion mit frischer Kultur positiv ausfiel. Wir haben festgestellt, daß dem mit der O-Form gewonnenen *Bien*schen Diagnosticum der Vorzug zu geben ist, gegenüber einem mit der H-Form gewonnenen. Im Laufe der Jahre ist es nun unter einer großen Zahl von Krankenseren 2 mal (1 mal auf unserer Abteilung, 1 mal auf der Krankenabteilung) vorgekommen, daß bei einer klinisch sicheren Fleckfiebererkrankung die Weil-Felixreaktion mit frischen X-Bacillen ganz negativ verlief, während sie mit dem aufbewahrten (erprobten) Diagnosticum nach *Bien-Sontag* positiv verlief. Es war also irgendeine Störung unterlaufen, die, wenn man sich allein auf die Agglutination der frischen Kultur verlassen hätte und auch keine positiven Kontrollsera zur Verfügung gehabt hätte, zu falschen serologischen Diagnosen geführt haben würde. Worauf in diesen beiden Fällen das Versagen der Kultur beruhte, ließ sich nicht ermitteln.





In den beiden erwähnten Fällen fiel also die Agglutination mit dem *Bien*schen Diagnosticum, das natürlich mit anderen Kulturen des X 19 Stammes hergestellt, trotz des Versagens der frischen Kulturen, positiv aus. *Wir möchten daher empfehlen, daß die Laboratorien, besonders wenn sie nicht laufend die Weil-Felixreaktion anstellen und nicht dauernd gute Kontrollsera zur Hand haben, sich erprobte Diagnostica nach Bien-Sontag vorrätig halten und bei negativem Ausfall einer Weil-Felixreaktion mit frischer Kultur immer erst den Ausfall der Agglutination nach 22—24 Stunden mit dem Diagnosticum abwarten.*

Die von *Kraus* und *Barrera* (l. c.) erwähnte Beobachtung, daß die Reaktionsfähigkeit des *Bien-Sontag*schen Diagnosticums schon nach kurzer Zeit abnahm, entspricht nicht unseren Erfahrungen. Wir bewahren seit Monaten verschiedene, nach *Bien-Sontag* hergestellte Diagnostica (H-Formen, O-Formen) auf, ohne daß sie bisher in ihrer Brauchbarkeit gelitten hätten.

Zum Schlusse seien noch einige *Agglutinationsversuche mit Serum von Kaninchen* angeführt, die *mit dem Darminhalt von Fleckfieberläusen* behandelt waren. Solche Versuche sind dringend erwünscht, wie dies schon *Otto* und *Winkler* (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **93**. 1921) hervorgehoben haben. Leider stand uns hier in Berlin nur wenig Material zur Verfügung. Indessen konnten wir 2 Kaninchen bisher mit Darminhalt von Läusen vorbehandeln, welche verschieden lange Zeit an Fleckfieberkranken gesaugt hatten. Der Darminhalt der Läuse wurde durch Ausquetschen der Tiere in 2,0 ccm physikalischer Kochsalzlösung aufgefangen und den Kaninchen intravenös injiziert. Während das eine Tier, dem der Inhalt von 16 Läusen, die 6 Tage gesaugt hatten, injiziert war, ebenso wie das Kontrolltier, keinen Titeranstieg zeigte, stieg der Titer bei dem zweiten Kaninchen, bei dem die zur Vorbehandlung dienenden 20 Läuse 8 Tage am Kranken gesessen hatten, für die O- und H-Form auf 1 : 20 +. Vor der Behandlung war der Titer 1 : 5 —. Die erste Blutentnahme erfolgte 6—9 Tage nach der Injektion der Läuseaufschwemmung. Da der Verlauf der Agglutinationskurve demjenigen entspricht, wie wir ihn nach der Injektion von infektiösem Meerschweinchenfleckfiebergehirn sehen, so tragen wir keine Bedenken, ihn auf das Vorhandensein von Fleckfiebervirus im Darminhalt der Läuse zurückzuführen. Wir möchten allerdings dabei bemerken, daß es uns nicht möglich war, bei der verhältnismäßig starken Verdünnung (2,0 ccm) des Darminhaltes die Rickettsien mit Sicherheit mikroskopisch nachzuweisen. Immerhin würde uns der Befund zeigen, daß Titer von 1 : 50, wie sie *Otto* und *Dietrich* (Dtsch. med. Wochenschr. 1917, Nr. 19) als Anfangsdosen bei ihren Untersuchungen verwandt hatten, so hoch sind, daß ihnen in der Tat damals etwaige Titersteigerungen bei einigen von ihnen behandelten Tieren entgangen sein können. Soweit uns bekannt, liegen



*Tabelle IX.*

| Lfd. Nr. | Bezeichnung des Kaninchens | Immunisiert am | Immunisiert mit | Art | Titer am | Titer H-Form | Titer O-Form |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 94 | 18. V. 21 | Magen-Darminhalt von 15 normalen Läusen in 2,0 ccm physiol. NaCl-Lösung verrieben | io. | 18. V. 21 | 1 : 5 ± ? | — |
| | | | | | 26. V. 21 | 1 : 5 + | — |
| | | | | | 31. V. 21 | 1 : 5 ± | — |
| | | | | | 6. VI. 21 | 1 : 5 ± | — |
| 2 | 467 | 19. VIII. 21 | Magen-Darminhalt von 16 Läusen, die 6 Tage an fleckfieberkranken Menschen gesaugt haben, in 2,0 ccm physiol. NaCl-Lösung verrieben | io. | 19. VIII. 21 | 1 : 5 — | 1 : 5 — |
| | | | | | 25. VIII. 21 | 1 : 5 — | 1 : 5 — |
| | | | | | 31. VIII. 21 | 1 : 5 — | 1 : 5 — |
| | | | | | 5. IX. 21 | 1 : 5 — | 1 : 5 — |
| 3 | 203 | 24. XII. 21 | Magen-Darminhalt von 20 Läusen, die 8 Tage am Kranken gesessen haben, in 2,0 ccm NaCl-Lösung verrieben | io. | 24. XII. 21 | 1 : 5 — | 1 : 5 + ? |
| | | | | | 2. I. 22 | 1 : 5 — | 1 : 5 + |
| | | | | | 6. I. 22 | 1 : 5 + | 1 : 5 + |
| | | | | | 10. I. 22 | 1 : 20 + | 1 : 20 + |
| | | | | | 23. I. 22 | 1 : 5 ± ? | 1 : 10 + |
| | | | | | 11. II. 22 | 1 : 5 — | 1 : 5 + |

in der Literatur leider bisher noch keine systematischen Untersuchungen über das Auftreten von Weil-Felixreaktionen bei Kaninchen nach der Vorbehandlung mit Fleckfieberläusen bzw. Rickettsienaufschwemmungen vor. Solche bleiben auch weiterhin noch dringend erwünscht.


## *Zusammenfassung.*

1. Auch nach Behandlung mit dem Fleckfiebervirus „Reinickendorf“ traten im Serum der Kaninchen Antikörper gegenüber Proteus X 19-Bazillen (positive Weil-Felixreaktion) auf. Die Ablesung der Reaktion erfolgte nach 22stündiger Beobachtung.

2. Bei einzelnen Kaninchen wurden gewisse Eigentümlichkeiten im Verlauf der Antikörperkurve beobachtet.

3. Es wird zur Anstellung der Weil-Felixreaktion beim fleckfieberverdächtigen Menschen neben der Agglutination mit frischen Kulturen die Agglutination mit dem *Bien-Sontag*schen Diagnosticum empfohlen.






(Aus dem Institut Robert Koch [Serologische Abteilung: Geh. Med.-Rat Prof. Dr. *R. Otto*].)

# Beiträge zu „Meinickes Trübungsreaktion". (M.T.R.)

Von

**Hans Munter,**

Assistent am Institut.

Die Trübungsreaktionen haben den bisherigen Flockungsreaktionen gegenüber den doppelten Vorteil, einmal, daß sie nicht mit der Lupe oder dem Agglutinoskop, sondern mit bloßem Auge abgelesen werden können, und zweitens, daß sie, bei den positiven Seris wenigstens, schon nach einigen Stunden ein Urteil erlauben. Trotz dieser Vorteile muß natürlich die Einführung einer Reaktion in die Praxis davon abhängig gemacht werden, ob sie auch an Sicherheit der bislang als Standardmethode anzusehenden WaR. entspricht.

Das von *Dold*[1]) inaugurierte Trübungsverfahren konnte in seiner ursprünglichen Methodik nach den Erfahrungen auf unserer Abteilung, über die von *Winkler*[2]) berichtet ist, nicht im obigen Sinne der WaR. gleichgestellt werden. Da die Methode u. a. mit dem Flockungs-Verfahren von *Sachs-Georgi*, die Verwendung cholesterinierter Extrakte gemeinsam hat, so zeigte die Reaktion auch dieselben Fehler, wie das ursprüngliche Verfahren von *Sachs-Georgi*; es flockten nämlich auch die Tuberkulosesera nach 20stündigem Stehen bei Zimmertemperatur in hohem Prozentsatz aus. Neuere Untersuchungen auf unserer Abteilung, welche sich mit dem verbesserten Verfahren von *Dold* [Formolkontrolle[3])] beschäftigen, sind noch nicht abgeschlossen.

Zu den Bemerkungen von *Dold* (Med. Klin. 1922, Nr. 7) möchten wir hier kurz folgendes anführen: Bei der Nachprüfung des von *Dold* angegebenen Verfahrens zeigte sich — wie oben erwähnt wurde —, daß die Seren von Tuberkulösen bei der zweiten Ablesung nach 20 Stunden in einem hohen Prozentsatz falsche positive Flockungen und so Veranlassung zu falschen Diagnosen gaben. Ein Teil dieser

---

[1]) Med. Klinik 1921, Nr. 31.
[2]) Med. Klinik 1921, Nr. 51.
[3]) Dtsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 8.



falschen Diagnosen ließ sich vermeiden, wenn man diejenigen Sera von vornherein ausschaltete, welche schon bei der ersten Ablesung (nach 3—4 Stunden) bei gleich starker Trübung der Serumkontrolle eine deutliche Trübung aufwiesen. Diese Sera als negativ zu bezeichnen, wäre, auch entsprechend den *Dold*schen Vorschriften, erst nach der zweiten Ablesung möglich gewesen. Um nun bei dieser Sachlage die Zahl der falschen Diagnosen einzuschränken, hat *Winkler* in diesem Falle, wo die klinische Diagnose: „Tuberkulose“ bekannt war, Sera mit derartigen unspezifischen Flockungen ausfallen lassen.

Bald nach *Dold* hat auch *Meinicke*[1]) eine Trübungsreaktion empfohlen, obgleich er nicht verkannte, daß einer nach kurzer Zeit abzulesenden Trübungsreaktion gewisse Bedenken entgegenstehen. Er verwandte als Ausgangsmaterial seine Ätherrestextrakte aus Pferdeherzen, denen er nach geeigneter Verdünnung außer Cholesterin noch als Verstärkungsmittel für die Trübung Balsamum tolutanum hinzufügte. Nach der Ansicht von *Sachs*[2]) ist wohl jedenfalls in der Cholesterinierung das wesentliche Moment zu suchen, wenngleich der Tolubalsam ein die Trübung verstärkender Faktor bedeuten möge.

Wir haben mit dieser Reaktion (M.T.R.) bei Verwendung eines Originalextraktes 1000 Sera untersucht und wollen über unsere Ergebnisse im folgenden berichten. Die Sera waren z. T. den regelmäßigen Einsendungen, die wir zur Anstellung der WaR. erhalten, entnommen, z. T. aber auch von uns aus Berliner Krankenhäusern zu diesem Zwecke angefordert worden. Wir berücksichtigten bei den letzteren besonders solche Patienten, die an folgenden Krankheiten litten: Tuberkulose, Endokarditis, Angina Plaut-Vincenti, Ulcera mollia, Scabies u. a. Wir glauben, daß gerade Kontrolluntersuchungen bei diesen Erkrankungen, die erfahrungsgemäß des öfteren Fehlresultate bedingen, bei Veröffentlichungen neuer Luesreaktionen allzuoft vernachlässigt werden. Der *Kliniker* wird aber solche Krankheiten nicht selten differentialdiagnostisch bei der Luesdiagnose in Betracht ziehen müssen und darum solche serologischen Fehlresultate besonders schmerzlich empfinden.

Bei der Technik der M.T.R. hielten wir uns streng an die von *Meinicke* angegebenen Richtlinien:

Eine beliebige Menge des (von der Adler-Apotheke in Hagen i. W. bezogenen) *Original*-Extraktes wurde in ein weithalsiges Gefäß gegeben, dazu schnell die 10fache Menge 2proz. NaCl-Lösung hinzugetan, das Ganze dann durch Hin- und Hergießen gut gemischt. Reagenzien, sowie die Mischgefäße und Pipetten — auch die zum Ansetzen der Reaktion erforderlichen Röhrchen — wurden $^1/_2$ Stunde bei 37° vorgewärmt. Je 1 ccm dieser Extraktverdünnung wurden in möglichst gleichweite Röhrchen zu je 0,4 ccm Serum (wir untersuchten nur in-

[1]) Dtsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 7 und Nr. 12.
[2]) Dtsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 27.



aktiviertes Serum, wie es zur WaR. schon gebrauchsfertig bereit stand[1]), hinzugefügt. Die Versuchsröhrchen kamen zunächst 1 Stunde in den Brutschrank (37°). Dann wurde das Resultat mit bloßem Auge gegen ein helles Fenster abgelesen (= 1. Ablesung). Die negativen Proben sind durchsichtig geblieben, die positiven zum größten Teil so stark getrübt, daß die Flüssigkeit vollkommen undurchsichtig geworden ist. Nach weiterem 2stündigen Brutschrankaufenthalt wurden die Ergebnisse noch einmal in der gleichen Weise abgelesen (= 2. Ablesung). Ein Teil der Sera (die stark getrübten) hatten sich dann vielfach infolge inzwischen eingetretener Ausflockung wieder etwas aufgehellt, während die leichten Trübungen der schwach positiven Sera sich verstärkt haben. Daran anschließend kam der Versuch die Nacht über wieder in den Brutschrank, um am nächsten Morgen die Resultate noch einmal abzulesen (= 3. Ablesung).

Mit jedem Serum ist am gleichen Tage, an dem der M.-T.-R.-Versuch angesetzt wurde, auch die WaR. angestellt. Die Resultate wurden am nächsten Tage miteinander verglichen. Bei Unstimmigkeiten der beiden Systeme stellten wir Rückfragen bei den einsendenden Ärzten an, um die klinische Diagnose mit der serologischen Diagnose auf Grund der M.T.R. und WaR. in Vergleich zu bringen. Wir sind uns dabei der Fehlerquellen, die solche Rückfragen mit sich bringen, vollauf bewußt geblieben. Alle irgendwie nicht geklärten Fälle, auch solche, bei denen wir auf unsere Rückfrage keine Antworten erhalten haben, führen wir unter der Rubrik: „Unsichere klinische Diagnose" auf.

Bei der nachfolgenden Tabelle I ist folgendes zu berücksichtigen: Wir haben die Ablesungen nach 1 und 3 Stunden in *einer* Rubrik zusammengefaßt, da wir irgendwelche nennenswerten Unterschiede nach diesen verschiedenen Zeiten nicht feststellen konnten. Im allgemeinen bestanden bei ihnen keine Zweifel, ob die M.T.R.-Diagnose positiv oder negativ lauten müßte, anders bei der 3. Ablesung, bei der außer der positiven und negativen Flockung ganz bestimmte schwach positive (±) Reaktionen gefunden wurden, die sich auch bei längerem Stehen weder verstärkten noch klärten. Somit bringt:

Rubrik I: Resultate der 1. und 2. Ablesung. Rubrik IIa: Resultate aller 3 Ablesungen (die „schwach positiven" der 3. Ablesung, als negativ gerechnet); Rubrik IIb: Resultate aller 3 Ablesungen (die „schwach positiven" der 3. Ablesung, sind als positiv berechnet).

Wir bezeichneten also ein Serum im Rubrik I positiv, wenn es bei den ersten beiden Ablesungen positiv bzw. schwach positiv war, in Rubrik IIa, wenn es in allen 3 oder nur in der 3. Ablesung positiv war, in Rubrik IIb, wenn es in allen 3 bzw. nur in der 3. Ablesung oder nur in der 3. Ablesung positiv bzw. „schwach positiv" war.

[1]) Die zur Wassermannschen Reaktion eingehenden Blutproben werden bei uns regelmäßig am nächsten Tage untersucht. Nur die am Sonnabend nachmittag bis Montag eingehenden Proben kommen erst am Dienstag zur Untersuchung.



*Tabelle I.*

| | % I 1. u. 2. Ablesung | % II a 1., 2. u. 3. Ablesung. ± wird als negativ berechn. | % II b 1., 2. u. 3. Ablesung. ± wird als positiv gerechn. |
|---|---|---|---|
| A. *Übereinstimmende* positive Resultate | 28,6 | 29,3 | 29,9 |
| Übereinstimmende negative Resultate | 57,1 | 53,1 | 48,9 |
| Übereinstimmende Resultate | 85,7 | 82,4 | 78,8 |
| B. *Differierende* Resultate: | | | |
| 1. Bei sicherer Lues: | | | |
| WaR.: negativ; M.T.R.: positiv | 3,8 | 6,2 | 8,4 |
| WaR.: positiv; M.T.R.: negativ | 3,6 | 2,9 | 2,3 |
| 2. Bei anscheinend Luesfreien: | | | |
| WaR.: negativ; M.T.R.: positiv | 2,1 | 2,5 | 3,1 |
| WaR.: positiv; M.T.R.: negativ | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| 3. Bei unsicherer klinischer Diagnose: | | | |
| WaR.: negativ; M.T.R.: positiv | 3,5 | 4,7 | 6,1 |
| WaR.: positiv; M.T.R.: negativ | 0,9 | 0,9 | 0,9 |
| | 100,0 | 100,0 | 100,0 |

In der folgenden Tabelle haben wir nun noch die „schwach positiven" Resultate der 3. Ablesung als „*zweifelhaft*" gerechnet, um alle gegebenen Möglichkeiten zu erschöpfen. Denn solche Grenzfälle lassen sich ja, ganz nach dem individuellen Ermessen desjenigen, der die Resultate abliest, verschieden beurteilen.

Dabei erhielten wir folgende Zahlen:

*Tabelle II.*

| | % |
|---|---|
| A. *Übereinstimmende* positive Resultate | 29,3 |
| Übereinstimmende negative Resultate | 48,9 |
| Übereinstimmende Resultate | 78,2 |
| B. *Differierende* Resultate: | |
| 1. Bei sicherer Lues: | |
| WaR.: negativ; M.T.R.: positiv | 6,2 |
| WaR.: positiv; M.T.R.: negativ | 2,3 |
| 2. Bei anscheinend Luesfreien: | |
| WaR.: negativ; M.T.R.: positiv | 2,5 |
| WaR.: positiv; M.T.R.: negativ | 0,4 |
| 3. Bei unsicherer klinischer Diagnose: | |
| WaR.: negativ; M.T.R.: positiv | 4,7 |
| WaR.: positiv; M.T.R.: negativ | 0,9 |
| 4. M.T.R.: *zweifelhaft* | 4,8 |
| | 100,0 |

Bei der Beantwortung der Frage, inwiefern die M.T.R. nun zur serologischen Luesdiagnostik brauchbar ist, müssen wir ganz besonders die Unterabteilungen $B_1$ und $B_2$ unserer Tabellen in Betracht ziehen.

Bei „sicherer Lues" ($B_1$) ergibt darnach die M.T.R. in 3,8% bis 8,4% mehr positive Resultate an als die WaR., während sie in 2,3% bis 3,6% der Fälle versagt.



Bei „anscheinend Luesfreien“ ($B_2$) erhalten wir 2,0% bis 3,1% (*unspezifische*?) positive Resultate gegenüber 0,4% (unspezifischen?) positiven Resultaten bei der WaR.

Der Vorteil, daß die M.T.R. einen so ansehnlichen Prozentsatz der Luesfälle noch angibt, die bei der WaR. uns entgehen, ist leider zu teuer erkauft durch den allerdings kleineren, trotzdem aber sehr stark in das Gewicht fallenden Prozentsatz *unspezifischer* Reaktionen.

Diese unspezifischen Reaktionen beobachten wir bei folgenden Fällen (die Stärke der Trübung ist durch die Zeichen + und ± angegeben):

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Serum | 2629 | M. T. R.: | + | Grippeexanthem[1]). |
| „ | 2784 | „ | + | Ekzem, unter Hebra-Salbe schnell abheilend. |
| „ | 3205 | „ | + | Hautausschlag, keine Lues. |
| „ | 3208 | „ | ± | Scabies. |
| „ | 2725 | „ | ± | Angina Plaut Vincenti. |
| „ | 2853 | „ | ± | Angina Plaut Vincenti. |
| „ | 2779 | „ | + | Ulcus molle. |
| „ | 2737 | „ | ± | Narben am Penis nach Ulcus molle. |
| „ | 3318 | „ | + | Bubonen, Exanthem, keine Lues. |
| „ | 2990 | „ | + | Ulcus cruris, keine Lues. |
| „ | 2790 | „ | ± | Gravida, keine Lues. |
| „ | 2858 | „ | + | Placentarblut, keine Lues. |
| „ | 3159 | „ | + | Multiple Sklerose. |
| „ | 3025 | „ | + | Neurasthenie, keine Lues. |
| „ | 3356 | „ | ± | Neurasthenie, keine Lues. |
| „ | 3193 | „ | + | Fieberhafte Endokarditis. |
| „ | 3584 | „ | + | Leukämie. |
| „ | 3125 | „ | ± | Tuberkulose. |
| „ | 3130 | „ | ± | „ |
| „ | 3300 | „ | ± | „ |
| „ | 3301 | „ | + | „ |
| „ | 2667 | „ | + | Ehekonsensuntersuchungen, keine klinische Lues. |
| „ | 2742 | „ | + | „ „ „ „ |
| „ | 3067 | „ | + | „ „ „ „ |
| „ | 2909 | „ | + | „ „ „ „ |
| „ | 3092 | „ | + | „ „ „ „ |
| „ | 3119 | „ | + | „ „ „ „ |
| „ | 3357 | „ | ± | „ „ „ „ |
| „ | 3580 | „ | + | „ „ „ „ |
| „ | 3208 | „ | + | „ „ „ „ |
| „ | 3545 | „ | ± | „ „ „ „ |

Wir möchten bei dieser Gelegenheit darauf hinweisen, daß wir bis in das kleinste alle Momente, welche für den Verlauf der Reaktion von Bedeutung sein könnten, beobachtet haben, da wir bereits aus unseren Erfahrungen mit der M.R. und D.M.R. wußten, daß zur richtigen Bewertung dieser Reaktionen sehr exaktes Arbeiten erforderlich ist. Trotzdem beobachten wir an 2 verschiedenen Tagen, daß sämtliche angesetzte Sera, einschließlich der Kontrollen, ein

[1]) Die folgenden Krankheitsbezeichnungen entsprechen den uns von den Ärzten gemachten Mitteilungen, für die wir ihnen auch hier unseren Dank aussprechen.



positives Resultat ergaben. Da wir dann bei der Wiederholungsuntersuchung derselben Sera negative Befunde erheben konnten, so müssen wir annehmen, daß die Röhrchen oder irgendeins der Reagenzien zwar genügend vorgewärmt waren, aber trotzdem sich in dem kalten Zimmer während der Zeit der Ansetzung der Reaktion sehr schnell abgekühlt haben. Es war nämlich an diesen beiden Tagen jedesmal ein Witterungswechsel mit stark abgekühlten Nächten eingetreten, so daß es in unseren Laboratoriumsräumen sehr kalt war. Wir erblicken in diesen Resultaten unangenehme Störungen, die der Methodik als solcher nicht zur Last gelegt werden dürfen. Die Fehlresultate, die wir an diesen beiden Tagen erhielten, haben wir deshalb auch in den vorstehenden Tabellen nicht mitverarbeitet. Immerhin zeigen uns diese Vorkommnisse, wie empfindlich das Verfahren ist.

*Fassen wir unsere Untersuchungsergebnisse zusammen*, so können wir der M.T.R. die gleiche Bedeutung, wie sie der WaR. in der serologischen Luesdiagnostik zukommt, in ihrer jetzigen Form noch *nicht* zusprechen, weil sie in einem gewissen Prozentsatz unspezifische positive Resultate aufweist.

Nach unseren bisherigen Erfahrungen ergab die D. M.R. (Dritte Meinicke-Reaktion) zwar prozentual weniger positive Resultate als die WaR.; auch fanden sich wohl z. B. bei Placentarblutproben unspezifische Reaktionen, doch haben wir derartige unspezifische Reaktionen wie bei der M.T.R. nicht beobachtet. Zur Erklärung dieser unspezifischen Reaktionsausfälle bei der M.T.R. kämen drei Möglichkeiten in Frage: Einmal die etwas verschiedene Technik (stärkere Serumkonzentration) und zweitens der Zusatz von Balsam zu einem (drittens) Cholesterinextrakt. Welcher von diesen Faktoren der ausschlaggebende ist, muß von den Ausfällen weiterer Untersuchungen abhängig gemacht werden. Wir hoffen, daß es gelingen wird, den störenden Faktor zu ermitteln, da diese Reaktion hinsichtlich Zeit- und Materialverbrauch von den zur serologischen Luesdiagnose in Frage kommenden Verfahren die geringsten Anforderungen stellt.



(Aus der sero-bakteriologischen Abteilung der Elektroosmose-Gesellschaft, Berlin, Lindenstraße 35.)

# Lyophile und lyophobe Eiweißkörper als Antigen und Antikörper.

Von

Prof. **W. G. Ruppel**, Dr. **O. Ornstein**, Dr. **J. Carl** und Dr. **G. Lasch.**

## *I.*

Im Blutserum befinden sich in der Hauptsache drei verschiedene Kategorien von Eiweißstoffen, die hinsichtlich ihrer Dispersität mit Wasser in lyophile oder hydrophile und in lyophobe oder hydrophobe Kolloide unterschieden werden müssen. Als hydrophobes Kolloid muß das Euglobulin bezeichnet werden, weil es mit reinem, d.h. elektrolytfreiem Wasser als Dispersionsmittel keine kolloidale Lösung zu bilden vermag, dagegen besitzt das Albumin und das in seinem chemisch-physikalischen Verhalten dem Albumin näherstehende Pseudoglobulin ausgesprochen hydrophile Eigenschaften. Die Dispersionen von Albuminen und Pseudoglobulinen in reinem Wasser sind so fein, daß sie äußerlich durchaus den Eindruck von echten Lösungen hervorrufen, und man erkennt ihren Charakter als kolloidale Dispersionen erst durch ihr Verhalten bei der Dialyse und der Ultrafiltration, sowie dadurch, daß sie das *Tyndall*sche Phänomen zeigen, wenn sie von einem Lichtstrahl getroffen werden. Bei den Dispersionen hydrophiler Kolloide setzt man voraus, daß die feinsten Teilchen sich in höchster Quellung befinden. Man hat diese innige Vermischung mit Wasser dadurch zu charakterisieren versucht, daß man die Teilchen hydrophiler Dispersionen direkt als hydratisiert bezeichnete, was zum Ausdruck bringen soll, daß man es hier mit einer wirklichen Verbindung von Wasser mit den dispersen Teilchen oder der dispersen Phase zu tun hat. Für die Albumine und die Pseudoglobuline des Blutserums trifft dies zweifelsohne zu. Dies beweist namentlich das Verhalten dieser Kolloide, wenn man ihre Dispersionen in Wasser der Einwirkung des elektrischen Stromes aussetzt.

Bekanntlich zeigen alle Kolloide im elektrischen Strom eine bestimmte Wanderungsrichtung und eine der Stromstärke proportionale Wanderungsgeschwindigkeit. Die feinsten Teilchen kolloidaler Dispersionen spielen also hier die Rolle von Anionen resp. von Kationen, je nachdem ihre Wanderungsrichtung zum positiven oder negativen Pol orientiert ist. Die Gesetzmäßigkeiten der Wanderung kolloidaler Teilchen im

elektrischen Stromgefälle bilden das Gebiet der Elektroosmose, die man als die Elektrochemie der Kolloide bezeichnen kann.

Das Verhalten der Kolloide im elektrischen Strom zwingt zu der Annahme, daß die dispersen Teilchen an sich mit Elektrizität beladen sind. Die elektrische Ladung der dispersen Teilchen ist maßgebend für die Stabilität des kolloidalen Zustandes (*Hardy*). Werden disperse Teilchen entladen, so wird der kolloidale Zustand aufgehoben, es tritt Ausflockung ein.

Die Ausflockung der Kolloide wird bewirkt durch den Zusatz von Elektrolyt, wobei für die Ausflockung der negativen dispersen Teilchen das Kation, für die Ausfällung elektropositiver Kolloide dagegen das Anion des zugesetzten Elektrolyten verantwortlich zu machen ist. (Grundgesetz *Hardys*.) Hierbei sind H-Ionen und OH-Ionen besonders wirksam; mehrwertige Ionen erweisen sich einflußreicher als einwertige Ionen.

Im elektrischen Strom findet Ausflockung an den Elektroden statt, und zwar an demjenigen Pol, nach welchem die dispersen Teilchen infolge ihrer elektrischen Ladung wandern.

Kolloide entgegengesetzter elektrischer Ladung sind bestrebt, sich gegenseitig aufzuflocken, jedoch besteht hierbei ein optimales Mengenverhältnis, so daß bei einem Überschuß an zugefügtem Kolloid mit entgegengesetzter Ladung nach vorübergehender Ausflockung wieder eine Dispersion ausgeflockter Teilchen eintreten kann.

Man erklärt sich das Vorhandensein der elektrischen Ladung bei den dispersen Teilchen neuerdings durch die Annahme, daß auf der Oberfläche der kleinsten Teilchen Ionen durch Adsorption gebunden sind. Das elektrische Verhalten der Kolloide würde hierdurch als Ionenreaktion an der Grenzfläche der dispersen Phase aufzufassen sein.

Dispersionen der Eiweißkörper in Wasser zeigen nun im elektrischen Strom ein in mancher Beziehung von den übrigen Kolloiden abweichendes Verhalten, welches dadurch bedingt ist, daß die Eiweißkörper die Molekularstruktur von komplexen Aminosäuren besitzen und infolgedessen als amphotere Elektrolyte aufzufassen sind. Sie besitzen als solche sowohl sauren wie basischen Charakter und können deshalb sowohl mit Säuren als auch mit Basen salzartige Verbindungen eingehen.

Die chemische Natur der Eiweißkörper zwingt zu der Annahme, daß sie sich gegenseitig zu komplexen Verbindungen vereinigen können, so daß man voraussetzen könnte, daß die einzelnen Eiweißkörper im Blutserum, also Albumin, Pseudoglobulin und Euglobulin im Serum oder Plasma nicht in freiem Zustande, sondern in Form eben jener komplexen Verbindungen vorkommen.

Salzfreies, also ungelöstes Euglobulin bildet mit gleichfalls salzfreien Pseudoglobulinlösungen vollkommen homogene Dispersionen, aus denen



das Euglobulin erst wieder durch Säurezusatz oder besser durch die Einwirkung des elektrischen Stromes nach voraufgegangenem Kochsalzzusatz niedergeschlagen werden kann.

Die Folge der Möglichkeit dieser gegenseitigen Bindung der Eiweißkörper im Blutserum ist es, daß keine der bisher gebräuchlichen Methoden eine quantitative Fraktionierung ermöglicht. Die Fällung der Euglobuline durch Einleiten von $CO_2$ in verdünntes Serum ist ebenso unvollständig wie die Fällung mit Essigsäure, und selbst nach wochenlang durchgeführter Dialyse findet keine Ausscheidung der Gesamtmenge des im Serum oder Plasma enthaltenen Euglobulins statt.

Das Studium der quantitativen Verteilung der einzelnen Eiweißkörper im Blutserum wird dadurch wesentlich erschwert, daß die Albumine in Euglobulin übergehen können. Diese Umwandlung findet statt beim Lagern einer salzhaltigen Albuminlösung, sie wird beschleunigt durch Erwärmen auf Körpertemperatur und Erhöhung der Alkalescenz ($^1/_{10}$ norm.) Eine fast quantitative Überführung des Albumins in Euglobulin aber kann dadurch erreicht werden, daß man mit Kochsalz oder Ammonsulfat (2—3%) versetzte Albuminlösungen der Einwirkung des elektrischen Stromes aussetzt.

Es ist von großem Interesse, daß diese Umwandlung von Albumin in Euglobulin auch im lebenden Organismus eintreten kann. Zunächst scheinen Ernährungsverhältnisse hierbei eine Rolle zu spielen, dann aber tritt eine rapide Zunahme des Euglobulingehaltes im Blutserum auf bei allen fieberhaften Erkrankungen und im Blutserum von Tieren, welche zum Zwecke der Immunserumbereitung mit Bakterientoxinen oder anderen bakteriellen Produkten behandelt werden.

Die Umwandlung von Albumin in Euglobulin findet nicht direkt statt, sondern es entsteht zunächst Pseudoglobulin, welch letzteres dann in Euglobulin übergeführt wird. Es ist aber höchst bemerkenswert, daß reine, vollkommen albuminfreie Dispersionen von Pseudoglobulin der Umwandlung in Euglobulin nicht unterliegen, dagegen werden in Gemischen von Albumin- und Pseudoglobulin beide Eiweißkörper allmählich in Euglobulin umgewandelt. Es sei schon an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß die spontane Abschwächung, welche alle Immunsera hinsichtlich ihrer spezifischen Wirksamkeit in den ersten Monaten nach der Entnahme des Blutes aus dem Tierkörper erleiden, auf der Überführung der hydrophilen in hydrophobe Kolloide beruht.

Man hat die Tatsache, daß kolloidale Dispersionen keine Stabilität besitzen, sondern daß in denselben eine mit der Zeit fortschreitende Ausflockung der dispersen Teilchen eintritt, als das „Altern" kolloidaler Lösungen bezeichnet. Die analog im Blutserum auftretenden Ausflockungen bestehen aus Euglobulin, ebenso besitzen die Ausflockungen, welche in Albumin- und Pseudoglobulinlösungen unter dem Einfluß des



elektrischen Stromes, und zwar im isoelektrischen Punkte an den Elektroden auftreten, durchaus den Charakter des Euglobulins, woraus gefolgert werden muß, daß mit der durch den elektrischen Strom bewirkten Ausflockung gleichzeitig eine Denaturierung der sog. löslichen Eiweißkörper des Blutserums eintritt. Der Prozeß der Ausflockung von an sich löslichem kolloidalem Eiweiß ist nicht reversibel. Es gelingt auf keine Weise, aus dem ausgeflockten Produkt Albumin oder Pseudoglobulin zu regenerieren.

Will man nun den elektrischen Strom zur Darstellung der verschiedenen Eiweißkörper des Blutserums verwenden, so muß man zur Verhinderung der Ausflockung unter allen Umständen vermeiden, daß dies Blutserum oder die kolloidalen Lösungen der betreffenden Eiweißkörper mit den stromzuführenden Elektroden in Berührung kommen. Man erreicht diese unerläßliche Versuchsbedingung dadurch, daß man zwischen die Elektroden und die zu verarbeitende Flüssigkeit Diaphragmen einschaltet. Man bedient sich also für diesen Zweck mit Vorteil eines Dreizellenapparates, dessen zur Aufnahme der zu verarbeitenden Flüssigkeit bestimmter Mittelraum von zwei Diaphragmenflächen begrenzt ist, während die beiden Außenräume, die fließendes Wasser enthalten, mit je einer (Platin-) Elektrode beschickt werden. Als Diaphragmen wählt man hierbei am besten pflanzliche und tierische Membranen, und zwar so, daß die pflanzliche Membran, also beispielsweise starkes Pergamentpapier, als kathodisches Diaphragma Verwendung findet, während der Anode tierische Blase als positives Diaphragma vorgelagert ist. Diese Anordnung der Diaphragmen ist unbedingt erforderlich, um den durch die Elektrolyse der Blutsalze entstehenden Ionen eine ungestörte und gleichmäßige Abwanderung zu gestatten. Wollte man sich damit begnügen, zwei gleichförmige Diaphragmen an beiden Polen zu verwenden, so würde man bei Verwendung zweier Diaphragmen pflanzlichen Ursprungs in der dem Einfluß des elektrischen Stromes zu unterziehenden kolloidalen Lösung stark saure Reaktionen erhalten, während bei Anwendung von zwei Diaphragmen aus tierischem Gewebe im Mittelraum Alkali im Überschuß gebildet würde. In beiden Fällen wäre die Folge eine tiefgreifende Veränderung des Eiweißes, die sich durch die Bildung von Acid- resp. Alkali-Albuminat dokumentieren würde. Es hat dies seinen Grund in der Tatsache, daß jeder Membran ein ganz bestimmtes elektrisches Potential eigentümlich ist. Pflanzliche Membranen sind durchlässig ausschließlich für Kationen, Membranen tierischer Herkunft dagegen ausschließlich für das Anion. Man muß deshalb pflanzliche Membranen stets nur als kathodisches Diaphragma, tierische Membranen dagegen als anodisches Diaphragma verwenden. Da nun aber überdies die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen eine sehr verschiedene ist, so wird die Wahl von aufeinander abgestimmten Dia-



phragmensystemen, bei welchen die Wasserstoff- und die Hydroxyl-Ionenkonzentration möglichst in den Grenzen gehalten werden kann, die eine Beeinflussung der Genuität des Eiweißes ausschließen, eine sehr wichtige Aufgabe sein. Durch eingehende Untersuchungen auf diesem Gebiet ist es gelungen, Systeme von Diaphragmen ausfindig zu machen und teilweise künstlich zu konstruieren, welche diesen Bedingungen durchaus gerecht werden. Mit Hilfe dieser Systeme gelingt es, Blutserum oder Blutplasma in wenigen Stunden von Elektrolyten und gleichzeitig von allen normalen und akzidentellen Stoffen, wie Aminosäuren, Kohlenhydraten, Albumosen und Pepton, kurz von allen chemischen Individuen zu befreien, deren Molekülgröße kleiner ist als die der genuinen Proteine, indem unter der Einwirkung elektrischer Ströme auf das im Mittelraum des beschriebenen Dreizellenapparates enthaltene Serum elektroosmotische neben elektrolytischen Prozessen zur Einwirkung gelangen.

In normalem Serum beträgt die Wasserstoff-Ionenkonzentration $p_H = 7{,}8-8{,}0$. Unter dem Einfluß des elektrischen Stromes zwischen geeigneten Diaphragmen erfährt diese Wasserstoffzahl folgende Veränderungen:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Nach | 1 | Stunde | $p_H = 8{,}4$ |
| ,, | 2 | ,, | $p_H = 7{,}2$ |
| ,, | 3 | ,, | $p_H = 6{,}8$ |
| ,, | 4 | ,, | $p_H = 6{,}4$ |

Während also die Reaktion im Serum zunächst an Alkalescenz etwas zunimmt, geht sie allmählich über den Neutralpunkt in eine deutlich saure Reaktion über, die auch gegen Lackmus, nicht aber gegen Kongo wahrnehmbar ist. Die Verhältnisse des elektrischen Stromes werden bei diesem Prozeß lediglich durch den Elektrolytgehalt des Serums reguliert. Im Anfange beträgt die Leitfähigkeit, ausgedrückt durch die Stromdichte, 15—18 Milliampere pro Quadratzentimeter bei einer mittleren Spannung von 30 Volt. Mit der Abnahme des Elektrolytgehaltes resp. der Abwanderung der Ionen sinkt die Stromdichte allmählich, bis sie bei der obenerwähnten Wasserstoffzahl $p_H = 6{,}4$ ein Minimum von 0,55 Milliampere pro Quadratzentimeter Elektroden- resp. Diaphragmenfläche erreicht, wobei die Spannung so reguliert wird, daß sie allmählich ansteigend zum Schluß ein Maximum von 220 Volt erreicht. Man arbeitet also mit einer Spannung von 70 Volt und einer durchschnittlichen Stromdichte von 10 Milliampere pro Quadratzentimeter Elektrodenfläche.

Bei einer Wasserstoff-Ionenkonzentration $p_H = 6{,}8$ beginnt das Euglobulin, d. h. jener Eiweißkörper im Serum, dessen Dispersion von der Anwesenheit von Elektrolyten und gleichzeitig von einer bestimmten OH-Ionenkonzentration abhängig ist, auszuflocken. Diese Flockung erreicht bei einer Wasserstoffzahl von $p_H = 6{,}4$ ihr Maximum. In diesem



Stadium ist der Prozeß zu unterbrechen, da bei weiterer Einwirkung des elektrischen Stromes die ausgeflockten Euglobulinteilchen in kathodischer Richtung zu wandern beginnen, um sich schließlich in Gestalt einer hornartigen Masse am kathodischen Diaphragma abzulagern. Um dies zu vermeiden, unterbricht man den Prozeß, sobald die Stromstärke nicht mehr sinkt, resp. die Wasserstoffzahl $p_H = 6{,}4$ erreicht ist, entnimmt die Flüssigkeit dem Apparat und trennt das ausgeflockte Euglobulin von dem noch in Lösung befindlichen Albumin und Pseudoglobulin mit Hilfe der Zentrifuge.

Das so gewonnene Euglobulin wird durch Waschen mit elektrolytfreiem Wasser von den letzten Spuren löslicher Proteine befreit und kann hierauf in schwach alkalischer physiologischer Kochsalzlösung gelöst werden.

Um die in dem völlig klaren Zentrifugat enthaltenen löslichen Eiweißkörper, nämlich das Albumin von dem Pseudoglobulin zu trennen, kann man zwei verschiedene Wege einschlagen. Einmal nämlich kann man das Pseudoglobulin durch Halbsättigung der Lösung mit Ammoniumsulfat ausfällen und hierauf den Niederschlag und das Filtrat mit Hilfe des elektrischen Stromes unter Beobachtung bestimmter Kautelen von anhaftendem Ammonsulfat befreien, oder man kann zur Trennung der beiden Proteine ein rein elektroosmotisches Verfahren anwenden.

Als komplexe Aminosäuren besitzen die Proteine die Natur amphoterer Elektrolyte, d. h. ihre elektrische Ladung und damit die Richtung ihrer Wanderung im elektrischen Strome ist abhängig von der Reaktion des Mediums, in welchem sie sich in kolloidaler Verteilung befinden. Bei alkalischer Reaktion spielen die Proteine die Rolle des Anions, in saurem Dispersionsmittel dagegen haben sie die Funktion des Kations.

Auf diese Tatsache gründet sich ein sehr wertvolles Verfahren zur elektroosmotischen Reinigung der Gelatine von dem ihr stets beigemengten genuinen Eiweiß. Für die Verwendung der Gelatine zu medizinischen Zwecken oder bei ihrer Anwendung als Emulsionsgelatine bei der Herstellung von photographischen Platten und Films wirkt die Beimengung von Eiweiß zur Gelatine höchst störend, und es war deshalb schon lange ein Problem der Gelatinefabrikation, eine Trennung von Gelatine und Eiweiß durchzuführen. Das elektroosmotische Verfahren, durch welches dieses Problem gelöst wurde, bedient sich eines sogenannten Vierzellenapparates. Dieser besteht aus einem vierkantigen Gefäß aus Hartgummi oder gummiertem Eisen, welches durch Einlage von drei Diaphragmen in vier Räume geteilt ist. Die äußersten Räume dienen zur Aufnahme der Elektroden, das der Anode zunächst gelegene Diaphragma hat positives, das der Kathode angelagerte negatives elektrisches Potential. Der von diesen beiden Diaphragmen begrenzte Mittelraum wird durch das dritte Diaphragma,





das sogenannte Wanderungsdiaphragma, in zwei Räume, nämlich in den anodischen und den kathodischen Mittelraum geteilt. Während das anodische und das kathodische Diaphragma aus semipermeablen Membranen bestehen, welche wohl dem Wasser, nicht aber gelösten Stoffen den Durchtritt gestatten, ist das Wanderungsdiaphragma so gewählt, daß es nicht nur für Wasser, sondern auch für gelöste Stoffe durchgängig ist.

Die Lösung der zu reinigenden Gelatine wird nun in den anodischen Mittelraum gebracht, während alle anderen Räume mit Wasser gefüllt werden. Schickt man nun durch den Apparat elektrische Ströme mit verhältnismäßig hoher Spannung, so tritt die Gelatine aus dem anodischen Mittelraum durch das Wanderungsdiaphragma in den kathodischen Mittelraum über, während das der Rohgelatine als Verunreinigung beigemengte Eiweiß im anodischen Mittelraum zurückgehalten wird.

In ganz analoger Weise kann man zur Trennung des Pseudoglobulins von Albumin verfahren. Man bringt die zuerst von den Elektrolyten befreite Lösung, welche das Gemisch beider Eiweißkörper enthält, entweder in den anodischen oder in den kathodischen Mittelraum des beschriebenen Vierzellenapparates, während man alle übrigen Räume mit Wasser anfüllt. Schickt man nun durch den Apparat elektrische Ströme von hoher Spannung (220—500 Volt), so beobachtet man zunächst, daß das fast elektrolytfreie System nur eine sehr geringe Leitfähigkeit besitzt. Um die Leitfähigkeit zu erhöhen und die Wanderung des Eiweißes einzuleiten, fügt man zu der Eiweißlösung, falls sich dieselbe im kathodischen Mittelraum befindet, geringe Mengen von Alkali hinzu, oder man versetzt das im anodischen Mittelraum befindliche Eiweißgemisch mit geringen Säuremengen (ungefähr bis $^1/_{10}$ Normalität erreicht ist). Es findet hierdurch ein sofortiger Anstieg der Stromstärke und ein Absinken der Spannung statt, während im ersten Falle Eiweiß in den anodischen, im zweiten Falle in den kathodischen Mittelraum wandert.

Es wurde nun erkannt, daß das Albumin bei dieser Versuchsanordnung vor dem Pseudoglobuin abwandert, und daß es bei häufiger Wiederholung des Alkali- resp. Säurezusatzes schließlich gelingt, reine Albumin- resp. Pseudoglobulinlösungen zu erhalten. Bei dieser Gelegenheit wurde nun eine andere Beobachtung gemacht, nämlich die, daß jede Wanderung von Eiweiß gleichzeitig von einer sehr starken Elektrophorese von Wasser, und zwar im entgegengesetzten Sinne der Eiweißwanderung begleitet ist. Diese Tatsache, welche zum Schluß berechtigt, daß in den Dispersionen hydrophyler Eiweißkörper Verbindungen der dispersen Teilchen mit Wasser vorliegen, kann man sehr vorteilhaft zur Konzentration von Eiweißlösungen mit Hilfe des elektrischen Stromes verwerten.

Die Elektrophorese und zwar die Anaphorese von Wasser aus den Lösungen von Albumin und Pseudoglobulin tritt übrigens, wenn auch



langsamer und quantitativ beschränkter, in Erscheinung, wenn man reinste, d. h. elektrolytfreie Lösungen der beiden Eiweißkörper in dem beschriebenen Wanderungsapparat hochgespannten elektrischen Strömen aussetzt. Es dürfte berechtigt sein, hieraus den Schluß zu ziehen, daß die dispersen Eiweißteilchen als solche elektrisch geladen sind. Diese Annahme wird durch die von *Reitstötter*[1]) ausgeführten Bestimmungen der Eisenzahlen für die nach obigen Methoden aus Blutserum in Reinheit dargestellten Eiweißkörper bestätigt. Die Bestimmung der Eisenzahl gründet sich bekanntlich auf die Beobachtung, daß lyophile Proteine und andere Kolloide das Eisenhydroxydsol zu beeinflussen, zu sensibilisieren vermögen. Diese Sensibilisierung dokumentiert sich dadurch, daß zur Ausflockung der Gemische von lyophobem Kolloid und Eisenhydrosol geringere Elektrolytmengen erforderlich sind als zur Ausflockung des reinen Eisenhydrosols. Auch die Beeinflussungen des Goldhydrosols, welches *Reitstötter*[2]) zur Bestimmung der Goldzahl von Albuminen und Pseudoglobulinen der verschiedensten Herkunft benutzte, müssen in demselben Sinne gedeutet werden, daß nämlich den dispersen Eiweißteilchen bestimmte elektrische Ladung eigentümlich ist, welche sie befähigt, mit den entgegengesetzt geladenen dispersen Teilchen des Gold- resp. Eisenhydroxydsols Verbindungen zu bilden. Es wurde hierbei gefunden, daß dem Albumin die stärkste, dem Pseudoglobulin eine mittlere und dem Euglobulin die schwächste Sensibilisierung des Eisenhydroxydsols und demzufolge auch elektrische Ladung eigentümlich ist, während bezüglich ihrer Wirkung als Schutzkolloide, welche bei der Bestimmung der Goldzahl zum Ausdruck kommt, die Euglobuline an erster, das Pseudoglobulin an zweiter und das Albumin an dritter Stelle steht.

Von den zahlreichen sonstigen Feststellungen chemischer und physikalisch-chemischer Natur, welche wir beim Studium der reinen Eiweißfraktionen des Blutserums machen konnten, steht jedenfalls die Tatsache der Überführbarkeit und des spontan erfolgenden Überganges des lyophilen in das lyophobe Eiweiß im Vordergrund des Interesses.

Versetzt man elektrolytfreie oder physiologisch besalzene Lösungen von Albumin mit Alkali, bis die Alkalescenz der Lösungen $^1/_{10}$ der Normalität entspricht, und hält die alkalische Flüssigkeit in Thermostaten bei einer Temperatur von 37°, so hat die Flüssigkeit nach zwei bis drei Tagen ihr Aussehen nicht verändert, säuert man dieselbe jedoch mit Hilfe einer beliebigen Säure an oder entfernt man aus der Flüssigkeit die Elektrolyte durch den elektrischen Strom in dem mehrfach erwähnten Dreizellenapparat, so wird mehr als die Hälfte des ursprünglich vorhan-

[1]) *R. Reitstötter*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap., Orig., **30**, 768. 1921.

[2]) Derselbe, ibid. **30**, 507. 1921.





denen Eiweißes ausgeflockt. Das ausgeflockte Produkt zeigt alle Kriterien des Euglobulins.

Versetzt man nun das Filtrat dieser Ausflockung mit dem gleichen Volum einer gesättigten Lösung von Ammoniumsulfat, so findet die reichliche Abscheidung eines Niederschlages statt, der sich in nichts von dem Pseudoglobulin aus frischem Blutserum unterscheidet.

Im Filtrat dieser Ammonsulfat-Fällung ist immer noch ein Teil unverändertes Albumin vorhanden, so daß also die Flüssigkeit nach dem Behandeln mit Alkali in der Wärme, wenigstens in qualitativer Beziehung, die Zusammensetzung von normalem Blutserum zeigt.

Läßt man eine alkalische Lösung von Albumin mehrere Wochen unter den angegebenen Bedingungen stehen, so hat sich am Boden des die Flüssigkeit enthaltenden Gefäßes ein starkes Sediment gebildet. Die Reaktion der Flüssigkeit ist sauer, und es sind kaum noch Spuren von Albumin und Pseudoglobulin vorhanden.

Das Blutserum eines normalen Pferdes hatte folgende Zusammensetzung:

| | |
|---|---|
| Gesamteiweiß in 100 ccm | 8,75 g |
| Albumin | 2,47 g |
| Pseudoglobulin | 4,25 g |
| Euglobulin | 2,03 g |

Das Pferd wurde mit Diphtherietoxin in der üblichen Weise immunisiert. Nach einer Immunisierungsperiode von sieben Wochen enthielt das Serum des Pferdes in 1 ccm ca. 300 AE. Die Zusammensetzung des Serums war folgende:

| | |
|---|---|
| Gesamteiweiß in 100 ccm | 9,00 g |
| Albumin | 0,85 g |
| Pseudoglobulin | 4,75 g |
| Euglobulin | 3,40 g |

In einem anderen Diphtherieserum, dessen Eiweißgehalt 7,8% betrug, waren kurz nach der Abscheidung vom Blutkoagulum ca. 2% Albumine vorhanden. Nachdem das vollkommen keimfreie Serum 3 Monate lang bei niederer Temperatur vor Licht geschützt aufbewahrt worden war, enthielt es überhaupt keine Albumine mehr, dagegen war sein Gehalt an Euglobulin wesentlich gestiegen. Ein Teil des Euglobulins hatte sich in Form eines Sediments abgeschieden.

Die Umwandlung des lyophilen in lyophobes Eiweiß im Blutserum wird bedeutend beschleunigt durch den zur Konservierung der Sera üblichen Zusatz von Phenol oder Kresol. Wie wir später noch eingehend besprechen werden, steht die Umwandlung von lyophilem in lyophobes Eiweiß in kausalem Zusammenhange zu der spontanen Abschwächung, welche alle sog. spezifischen Immunsera hinsichtlich ihres Wirkungswertes erfahren.



Die hier geschilderte Umwandlung ist nun keineswegs auf das Albumin beschränkt, sondern sie kann in gleicher Weise auch das Pseudoglobulin ergreifen. Alte abgelagerte Sera enthalten meist überhaupt nur noch Spuren von lyophilem Eiweiß. Es ist aber höchst bemerkenswert, daß reines, aus frischem Blutserum isoliertes Pseudoglobulin zu der spontanen Umwandlung in Euglobulin nicht befähigt ist. Wir haben physiologisch besalzene, schwach alkalische Pseudoglobulinlösungen länger als 4 Jahre in geschlossenen Ampullen aufbewahrt, ohne daß die Bildung von Euglobulin beobachtet wurde.

In Gemischen von Albumin und Pseudoglobulin bleibt die Umwandlung in lyophobes Eiweiß nicht auf das Albumin beschränkt, sondern ergreift auch das Pseudoglobulin. Es könnte sonach den Anschein erwecken, als ob dem Albumin für die Überführung von lyophilem in lyophobes Eiweiß katalytische Eigenschaften zukämen; tatsächlich aber verläuft die Reaktion derartig, daß aus dem relativ labilen Molekül des Albumins durch hydrolytischen Abbau Aminosäure abgespalten wird, wodurch jenes Zwischenprodukt entsteht, welches wir Pseudoglobulin nennen. Durch den Einfluß der freien Aminosäure aber wird das Pseudoglobulin in das lyophobe Euglobulin übergeführt. Ist kein Albumin zugegen, so fehlt die Quelle für die Bildung freier Aminosäure und somit die Möglichkeit für die Umwandlung des Pseudoglobulins. Aus diesem Grunde sind reine Pseudoglobulinlösungen dauernd unverändert haltbar.

Die Abscheidung von Euglobulin aus dessen Lösungen in elektrolythaltigem Wasser oder aus Blutserum dadurch, daß man dem Lösungsmittel die Elektrolyte entzieht, ist ein reversibeler Prozeß, denn man kann die Auflösung des abgeschiedenen Eiweißes durch Zusatz von Elektrolyten jederzeit wieder herbeiführen.

Bei häufiger Wiederholung des Vorganges findet allerdings eine Denaturierung des Euglobulins statt, dasselbe wird vollkommen unlöslich.

Der Prozeß der Umwandlung von Albumin in Pseudoglobulin und Euglobulin ist nicht reversibel. Es ist bisher nicht gelungen, aus Euglobulin Albumin zu regenerieren. Überall dort, wo in der Natur Eiweiß als Produkt des regenerativen Stoffwechsels auftritt, finden sich neben lyophilen lyophobe Eiweißgruppen. So enthält die Molke der Milch neben dem lyophilen Albumin und dem Pseudoglobulin lyophobes Euglobulin; dasselbe ist im Albumen der Eier der Fall, ferner kann man auch dort, wo Eiweiß als Sekretionsprodukt pflanzlicher Zellen, also namentlich von Bakterien, in das die Zellen umgebende Medium abgesondert wird, lyophile von lyophoben Eiweißgruppen voneinander unterscheiden.

Wir glauben berechtigt zu sein, den fließenden Übergängen zwischen lyophilem und lyophobem Eiweiß eine besondere Bedeutung bei allen Lebensvorgängen zuzuschreiben, und haben uns bemüht, den Nachweis



zu erbringen, daß die hier von allgemeinen Gesichtspunkten aus geschilderten Verhältnisse namentlich für die Immunitätsvorgänge von hervorragender Bedeutung sind.

In erster Linie schien es uns von Interesse, die Frage nach der Antigennatur der einzelnen von uns aus Blutserum isolierten Eiweißfraktionen zu entscheiden. Dieser Frage muß gerade jetzt besondere Bedeutung zugemessen werden, weil durch die Einführung der parenteralen Eiweißtherapie dem normalen Eiweiß eine besondere Bedeutung als unspezifisches Antigen bei der Bekämpfung der verschiedensten Krankheitsprozesse beigemessen wird. Es wurde bereits von verschiedenen Autoren, wie z. B. von *Doerr* und *Berger*[1]) darauf hingewiesen, daß bei der Verwendung von Pferdeserum zur unspezifischen Eiweißtherapie der bisher übliche Begriff „artfremdes Eiweiß" als ungenau zu verwerfen ist, da man Serum überhaupt nicht als einheitliches Antigen ansprechen darf, sondern als einen Komplex von Stoffen, dem ebenso viele Antigene entsprechen, wie differente Eiweißkörper darin enthalten sind. *Doerr* und *Berger* haben deshalb, ebenso wie bereits frühere Autoren, die Antigennatur der einzelnen im Blutserum enthaltenen Eiweißkörper dadurch zu studieren versucht, daß sie das Sensibilisierungsvermögen und die den anaphylaktischen Schock auslösende Fähigkeit der aus Pferdeblutserum hergestellten Fraktionen an Meerschweinschen feststellten. Wir haben solche Versuche mit den von uns hergestellten Eiweißfraktionen gleichfalls angestellt, da es a priori nicht feststand, ob die von uns auf elektro-osmotischem Wege isolierten Eiweißkörper mit den nach anderen Methoden erhaltenen Präparaten durchaus als identisch anzusehen sind.

Unsere Resultate waren folgende:

Bei Meerschweinchen, vorbehandelt mit reinen, physiologisch besalzenen Albuminlösungen vermag die zur Vorbehandlung benutzte Albuminlösung nur gelegentlich anaphylaktische Reaktion auszulösen; dagegen lösen Pseudoglobuline und Euglobuline bei den mit Albumin vorbehandelten Tieren typischen anaphylaktischen Schock aus.

Tiere, vorbehandelt mit Pseudoglobulin, sind anaphylaktisch gegen Pseudoglobulin und gegen Euglobulin, dagegen nicht gegen Albumin.

Mit Euglobulin, gelöst in schwach alkalischer, physiologischer Kochsalzlösung, vorbehandelte Tiere sind anaphylaktisch gegenüber dem zur Vorbehandlung benutzten Euglobulin, ebenso wie gegen Pseudoglobulin, dagegen löst Albumin auch bei diesen Tieren keinen anaphylaktischen Schock aus.

Von den drei geprüften Eiweißkörpern besitzt das Euglobulin entschieden die ausgesprochenste antigene Wirkung. Alle mit gelöstem Euglobulin vorbehandelten Tiere gehen bei der Nachbehandlung mit

[1]) *R. Doerr* und *W. Berger*, Klin. Wochenschrift **1**, **19**, 1922.





Pseudoglobulin- und Euglobulinlösungen prompt zugrunde. Die Antigennatur des Pseudoglobulins ist schwächer als die des Euglobulins. Bei der Reinjektion mit Pseudoglobulin- und Euglobulinlösungen bleiben einige Tiere am Leben, andere sterben erst innerhalb von 12—24 Stunden nach der den Schock auslösenden Injektion.

Was die Präcipitationsbildung anbelangt, so verhalten sich die verschiedenen Eiweißfraktionen folgendermaßen:

Das Albumin vermag überhaupt kein präcipitierendes Serum zu bilden.

Pseudoglobulin erzeugt ein Serum, welches ausschließlich Pseudoglobulin, dagegen weder Euglobulin noch Albumin präcipitiert.

Anti-Euglobulinserum ruft in Euglobulin- und Pseudoglobulinlösungen Präcipitation hervor, hierbei aber ist die Wirkung auf das homologe Eiweiß, also auf das Euglobulin in quantitativer Hinsicht bedeutend stärker als die präcipitierende Wirkung auf das Pseudoglobulin. Albuminlösungen werden von Anti-Euglobulinserum nicht beeinflußt.

Die Versuche zur Herstellung präcipitierender Sera haben also gleichfalls erwiesen, daß dem Euglobulin die stärksten, dem Albumin die schwächsten antigenen Eigenschaften zukommen, während das Pseudoglobulin in dieser Beziehung dem Euglobulin nähersteht als dem Albumin. Durch diese Befunde wird die Zugehörigkeit des Pseudoglobulins zu den Globulinen erwiesen und damit die Ansicht derer widerlegt, welche dieses lyophile Globulin den Albuminen an die Seite stellen und sogar die Bezeichnung Pseudoalbumin vorgeschlagen haben.

Welche Folgerungen aus den Versuchsergebnissen für die parenterale Proteinkörper-Therapie zu ziehen sind, läßt sich zurzeit noch nicht entscheiden. Jedenfalls scheint es notwendig zu sein, die einzelnen Eiweißfraktionen einer klinischen Prüfung zu unterziehen und festzustellen, welche Rolle jede dieser Fraktionen bei der unspezifischen Eiweißtherapie spielt, und welchen Wert sie für diese Therapie haben könnte. Solche Versuche sind eingeleitet.

Ferner erschien es von nicht unerheblichem Interesse, zu untersuchen, in welcher Weise die in einem spezifischen Immunserum enthaltenen Antikörper auf die einzelnen Eiweißfraktionen des Blutserums verteilt sind, und mit welcher dieser Fraktionen die Schutz- und Heilkraft der Sera verbunden ist. Nach der bisherigen Auffassung könnten beide Fragestellungen als identisch erscheinen. Dies ist jedoch, wie wir im Verlaufe unserer Darlegungen zeigen werden, durchaus nicht der Fall.

Wir wollen als Paradigma für unsere Ausführungen zunächst das Schweinerotlaufserum wählen, erstens, weil der Schutz- und Heilwert dieses antiinfektiösen Serums mit großer Schärfe durch die Prüfung am



Tiere festgelegt werden kann, und zweitens, weil dieses Serum alle jene Stoffe, nämlich Agglutinine, Präcipitine, Bakteriotropine und komplementbindende Substanzen enthält, welche man bisher als die eigentlichen spezifischen Antikörper angesprochen hat und mit der präventiven und kurativen Kraft eines spezifischen Immunserums in einen ursächlichen Zusammenhang gebracht hat.

Wir fanden, daß die Agglutinine sowohl mit dem Euglobulin wie auch mit dem Pseudoglobulin des Rotlaufserums verbunden sind, so zwar, daß dem Euglobulin weitaus die Hauptmengen der in einem Serum enthaltenen Agglutinine anhaften, während dem Pseudoglobulin verhältnismäßig nur geringe agglutinierende Kraft innewohnt. Ebenso verhalten sich die Präcipitine, d. h. jene Stoffe, welche in klaren Extrakten von Rotlaufbacillen oder in keimfreien Rotlaufbouillonkulturen charakteristische Niederschläge zu erzeugen vermögen.

Das Euglobulin ist der alleinige Träger der komplementbindenden Fähigkeit des Serums. Pseudoglobulin und Albumin besitzen nicht die Eigenschaft, Komplement zu verankern.

Dieselbe Beobachtung wurde beim Rotzserum und beim Luesserum gemacht. Die aus Luesserum mit ausgesprochen positiver *Wassermann*scher Reaktion isolierten Euglobuline enthielten, wie durch exakte quantitative Untersuchungen ermittelt wurde, die Gesamtmenge der komplementbindenden Substanz, ebenso wie die bei vielen Seren beboachtete Selbsthemmung (Komplementbindung ohne Antigen) stets nur mit dem Euglobulin nachgewiesen werden konnte, und zwar ergab eine reine Euglobulinlösung, welche in der Volumeinheit genau so viel Euglobulin enthielt wie das ursprüngliche Serum, genau in derselben Menge das Phänomen der Selbsthemmung wie das Serum als solches.

Die Tatsache, daß der komplementbindende Antikörper an das lyophobe Eiweiß des Blutserums gebunden ist, welches man auf elektroosmotischem Wege in kürzester Zeit und in großer Reinheit abzuscheiden vermag, könnte vielleicht für die Handhabung der Lues- und der Malleusdiagnose von praktischer Bedeutung werden.

Von größtem Interesse ist die von uns festgestellte Tatsache, daß der hämolytische Amboceptor in den üblichen Blutkörperchen-Antiseris ausschließlich mit der Pseudoglobulinfraktion des hämolytischen Serums verbunden ist. Es wird hierdurch der prinzipielle Unterschied des hämolytischen Amboceptors und des *Bordet*schen Antikörpers erwiesen. (Gleiches Verhalten wie die hämolytischen zeigen die bakteriolytischen Amboceptoren, — davon später.)

Einfügen möchten wir an dieser Stelle, daß eine Isolierung des Komplements aus normalem Meerschweinschenserum oder vielmehr der Nachweis, daß auch das Komplement an eine bestimmte Eiweißfraktion



im Serum gebunden ist, nicht gelang. Das Komplement wird im elektrischen Potentialgefälle schon nach wenigen Minuten zerstört.

Zurückkommend auf das Schweinerotlaufserum verdient zunächst hervorgehoben zu werden, daß die im Tierexperiment festzustellende und genau titrierbare Schutzwirkung des Serums fast ausschließlich mit der Pseudoglobulinfraktion des Serums kombiniert ist. Albumine besitzen keine, Euglobuline nur sehr unbedeutende Schutzwirkung. Ebenso sind die Bakteriotropine (eingestellt nach der Methode von *Neufeld*) wesentlich an das Pseudoglobulin gebunden.

Aus den hier mitgeteilten Versuchsergebnissen muß zunächst geschlossen werden, daß Agglutinine und Präcipitine für die Schutzwirkung eines Immunserums ebensowenig Bedeutung haben wie der sogenannte „*Bordet*sche Antikörper".

Aber auch die Bakteriotropine können mit den eigentlichen Immunkörpern, die für die Schutzwirkung der spezifischen Sera verantwortlich zu machen sind, nicht ohne weiteres identifiziert werden, denn es wurde von uns mehrfach die Beobachtung gemacht, daß in einem antibakteriellen Serum der bakteriotrope Titer vollkommen erhalten blieb, während die Schutzkraft des Serums eine sehr erhebliche Abschwächung erfuhr.

Für die praktische Anwendung anti-infektiöser Sera als Schutz- und Heilmittel gegen Infektionskrankheiten wird die auf elektro-osmotischem Wege in so einwandfreier und bequemer Weise durchführbare Isolierung des Pseudoglobulins entschieden von größter Bedeutung sein. Sie gewährleistet zunächst die dauernde Haltbarkeit des Serums resp. die absolute Konstanz des Wirkungswertes. Gerade bei den antibakteriellen Seris ist die Abschwächung des Wirkungswertes bei längerem Aufbewahren eine sehr erhebliche. Ein weiterer Vorteil der Anwendung reinen Pseudoglobulins an Stelle des Vollserums liegt darin, daß man auf diesem Wege durch die Beseitigung des Euglobulins als desjenigen Eiweißstoffes im Blutserum, welcher mit den ausgesprochensten antigenen Eigenschaften ausgestattet ist, die Gefahren der Serumkrankheit resp. der Anaphylaxie vermindert und überdies die Einwirkung von Reaktionsprodukten auf den zu schützenden oder zu heilenden Organismus vermeidet, die, wie beispielsweise die Agglutinine und der *Bordet*sche Antikörper, mit der eigentlichen Schutz- und Heilwirkung der Sera nichts zu tun haben.

Dieselben Gründe hatten uns veranlaßt, auch die antitoxischen Sera, und zwar namentlich das Diphtherieserum und das Tetanusserum in der gleichen Richtung zu untersuchen. Bei diesen beiden Seris ist das Antitoxin weitaus in seiner größten Menge an das Pseudoglobulin des Serums gebunden. Das Albumin ist frei von Antitoxinen, während am Euglobulin höchstens 12–15% des Antitoxingehaltes haften.



Dies trifft jedoch nur für frisches Serum zu, denn beim Lagern antitoxischer Sera findet mit der durch die Gegenwart des Albumins und durch andere Momente bedingten Umwandlung von Pseudoglobulin auch eine Veränderung der quantitativen Verteilung des Antitoxins auf die verschiedenen Eiweißfraktionen statt.

Das Albumin hat als nicht differenziertes Eiweiß naturgemäß mit den Antikörperfunktionen eines Serums nichts zu tun. Daß aber von den Globulinen vorzugsweise das lyophile Pseudoglobulin mit höchster antitoxischer Kraft beladen ist, beruht auf dem hohen Dispersitätsgrade dieses Kolloids in Wasser. Hierdurch bietet dasselbe dem Antigen, also dem Toxin in diesem speziellen Falle, eine sehr große Oberfläche und dadurch das größte Bindungsvermögen dar. Der Übergang von lyophilem in lyophobes Eiweiß ist stets mit dem Verlust der Dispersität, mit bedeutender Verminderung der Oberfläche und folglich mit dem Verlust an spezifischem Bindungsvermögen verbunden, was zahlenmäßig als Antitoxinverlust imponiert.

Die Umwandlung von Pseudoglobulin in Euglobulin und damit die spontane Abschwächung des Antitoxingehaltes eines Serums kann nun durch verschiedene Momente veranlaßt werden. Einmal ist die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, daß in einem Immunserum stets Antigene vorhanden sind, die das Antitoxin allmählich verankern, wobei erfahrungsgemäß lyophiles in lyophobes Eiweiß umgewandelt wird. Das Restantigen in einem Serum ist stets an das Euglobulin gebunden. In diesem Falle würde also das Euglobulin für die Verminderung des Gehaltes an lyophilem Eiweiß und damit für die spontane Abschwächung des Antitoxingehaltes im Serum verantwortlich zu machen sein.

Sodann kann die Umwandlung außerdem von seiten des Albumins infolge rein chemischer Umsetzung erfolgen. Das Albumin ist stets bestrebt, sich in lyophobes Eiweiß umzuwandeln (Altern kolloidaler Lösungen). Diese Umwandlung ist mit der Abspaltung von Aminosäuren aus dem Molekül des Albumins verbunden. Durch die Einwirkung von Säuren wird auch das Pseudoglobulin allmählich von dieser Umwandlung ergriffen und geht gleichfalls in Euglobulin über. Es handelt sich hierbei um einen graduell fortschreitenden Prozeß, der erst dann zum Stillstand kommt, wenn die Säure durch die aus dem Eiweißmolekül abgespaltenen basischen Atomgruppen abgestumpft, resp. neutralisiert wird. In alten Seris ist die Menge des lyophoben Eiweißes meistens eine so große, daß ein Teil desselben abgeschieden wird und mehr oder weniger beträchtliche Bodensätze bildet. In solchen Seris ist häufig überhaupt fast kein lyophiles Eiweiß mehr vorhanden, und der größte Teil des Antitoxins ist an Euglobulin gebunden. Es verdient hervorgehoben zu werden, daß in frischem und namentlich in hochwertigem antitoxischem Serum das Euglobulin nur ganz unwesentliche Mengen von Antitoxin



enthält, während die Hauptmenge des Antitoxins am Pseudoglobulin verankert ist. Es muß nun die Frage aufgeworfen werden, ob das an Euglobulin gebundene Antitoxin z. B. beim Diphtherieserum im erkrankten Organismus dieselbe kurative, d. h. toxinbindende Rolle zu spielen vermag wie das Antitoxin, welches im genuinen Serum ausschließlich mit dem Pseudoglobulin verankert ist. Nach unseren Erfahrungen über die Immunstoffverteilung in antitoxischen und in antiinfektiösen Seren kommt für die Schutz- und Heilwirkung der Sera in erster Linie das lyophile Eiweiß in Betracht. Die Euglobuline spielen überdies im Organismus die Rolle von Exkretionsprodukten, die durch ihre ausgesprochene Antigennatur den Organismus zu energischen Abwehrreaktionen veranlassen.

Diese Überlegungen lassen die Forderung als berechtigt erscheinen, an Stelle des bisher gebräuchlichen Diphtherieserums ein vollkommen reines antitoxisches Pseudoglobulinpräparat zu verwenden[1]).

Zusammenfassend seien hier nochmals die Vorzüge hervorgehoben, die die Anwendung eines auf elektro-osmotischem Wege dargestellten Pseudoglobulins gegenüber der Verwendung von Diphtherie-Vollserum besitzt:

1. Das Pseudoglobulin aus Diphtherieserum besteht ausschließlich aus antitoxischem Eiweiß, alle übrigen Bestandteile des Serums wie anorganische Salze, Aminosäuren, Kohlenhydrate, Lipoide, Cholesterin sowie vor allen Dingen alles unspezifische Eiweiß sind entfernt worden.

2. Die Abwesenheit aller nicht mit Antitoxin beladenen Eiweißkörper gewährleistet die rein antitoxische Wirkung des Präparates, wobei der Einfluß des in seiner Wirkung auf den Krankheitsprozeß und auf das Allgemeinbefinden der Patienten vollkommen unkontrollierbaren unspezifischen Eiweißes ausgeschlossen ist.

3. Die Gefahr der Anaphylaxie resp. der Serumkrankheit ist, und zwar namentlich durch die Abwesenheit von lyophobem Eiweiß (Euglobulin), vermindert.

4. Die Abwesenheit von lyophobem Eiweiß gewährleistet wegen der gegenüber normalem Serum stark verminderten Viscosität die raschere und erleichterte Resorption des Präparates.

5. Das antitoxische Pseudoglobulin ist hinsichtlich seiner physikalischen Beschaffenheit und seines Antitoxingehaltes dauernd unverändert haltbar.

6. Die Isolierung des reinen Pseudoglobulins, also des eigentlichen Trägers der spezifischen Schutz- und Heilkraft eines Immunserums und

[1]) Die Farbwerke vorm. Meister, Lucius & Bruening zu Höchst a. M. geben seit einiger Zeit reines antitoxisches Pseudoglobulin unter der geschützten Bezeichnung: *Behrings Diphtherie-Heilmittel „Elo“*, Elektro-Diphtherieheilmittel Höchst ab, welches nach der hier geschilderten elektro-osmotischen Methode von *Ruppel* hergestellt wird und der staatlichen Kontrolle unterstellt ist.



seine prophylaktische und therapeutische Anwendung zur Bekämpfung der Infektionskrankheiten an Stelle der entsprechenden Vollsera ist noch von einem anderen Gesichtspunkt aus von großer Wichtigkeit.

Zum Zwecke der Serumgewinnung werden Tiere mit toxinhaltigen Kulturflüssigkeiten, mit lebenden oder abgetöteten Infektionserregern oder mit Extrakten aus deren Leibessubstanz, jedenfalls aber mit Konglomeraten von Antigenen behandelt, deren Abbau im tierischen Organismus zeitlich und der Art nach ein durchaus verschiedener ist.

Zur Herstellung des Diphtherieserums werden Tiere mit keimfreien oder mit nur tote Diphtheriebacillen enthaltenden Kulturflüssigkeiten behandelt. Naturgemäß enthalten diese Kulturflüssigkeiten neben dem eigentlichen Diphtherietoxin eine ganze Reihe von spezifischen und unspezifischen Antigenen, mithin besteht zum mindesten die Möglichkeit der Anwesenheit solcher Antigene in dem bisher gebräuchlichen Diphtherieserum, worauf zum Teil die Spontanabschwächung der Antisera beruhen dürfte.

Die elektro-osmotische Verarbeitung des Serums gewährleistet nun die vollkommene Beseitigung aller im Ausgangsserum etwa noch vorhandenen Antigene, die, soweit sie diffusibel sind, während der Osmose durch Wanderung oder, soweit sie die Diaphragmen nicht zu durchdringen vermögen, gleichzeitig mit dem lyophoben Eiweiß aus dem Serum entfernt werden.

7. Mit der Abscheidung des Pseudoglobulins ist überdies eine Konzentration der wirksamen Stoffe insofern verbunden, als das Pseudoglobulin naturgemäß auf 1 g feste Substanz berechnet, stets mehr Antitoxin enthält als das Vollserum. Enthält beispielsweise ein Diphtherieserum, dessen Eiweißgehalt 10% beträgt, in 1 ccm 300 resp. auf 1 g Eiweiß 3000 Antitoxineinheiten, so erhält man aus 100 ccm dieses Serums 5 g Pseudoglobulin mit einem Antitoxingehalt von 24 000 AE., woraus sich für 1 g Eiweiß 4800 AE. ergeben. Diese Tatsache ist nun nicht nur von technischer Bedeutung, indem sie eine künstliche Konzentration des Antitoxingehaltes ermöglicht, sondern sie hat deshalb allgemeines Interesse, weil man hierdurch in die Lage versetzt wird, Serumpräparate mit geringerem Eiweißgehalt anzuwenden als bisher.

## *II.*

Wir haben uns weiterhin eingehend mit antitoxischem Choleraserum beschäftigt, über dessen Wirkungsmechanismus kürzlich berichtet[1]) und dessen Herstellung[2]) dabei angeregt wurde.

[1]) *Otto Ornstein*, Über die Rolle der Tropine und Antitoxine bei der experimentellen Choleraimmunität. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **96**, H. 1. 1922.

[2]) Dieses antitoxische Choleraserum wird von der chemischen Fabrik und Seruminstitut „Bram“, Ölzschau b. Leipzig, hergestellt, elektro-osmotisch gereinigt und hoch eingestellt in den Handel gebracht.



Die Verhältnisse liegen bei der Zerlegung dieses Serums ganz ähnlich wie bei den übrigen antitoxischen Seren.

Auch beim antitoxischen Choleraserum findet bei der Immunisierung der Pferde eine Verschiebung der einzelnen Eiweißfraktionen statt.

Die Sera zeigen im Laufe der Immunisierung im allgemeinen ein Abnehmen ihres Albumingehaltes, doch können, zumal hochwertige Sera, immer noch beträchtliche Mengen von Albumin aufweisen (2—1%).

Die Pseudoglobuline zeigen im Beginn der Immunisierung keine wesentliche Verschiebung gegen die Norm (3—4%); erst bei hochwertigen Seren steigt ihre Menge an (4—6%), indes die Euglobuline bei mittelmäßigen Seren die Albumindifferenz aufweisen und damit beträchtliche Werte zu erreichen (2—<3%), bei hochwertigen Seren zugunsten des Pseudoglobulins wieder abzunehmen pflegen (2—1%). Träger des Antitoxins ist im wesentlichen das Pseudoglobulin. Im engen Zusammenhange mit diesen Verhältnissen der Eiweißverschiebung steht die Spontanabschwächung der Sera: Mittelmäßige Sera, wie man sie im Beginn der Immunisierung erzielt, pflegen sich erfahrungsgemäß am schnellsten und nachhaltigsten abzuschwächen, es sind gewissermaßen unreife Sera, welche diese Eigenschaft in der Antitoxinverteilung auf die Pseudoglobuline und Euglobuline dokumentieren; sie weisen hohe Euglobulinmengen und mit diesen unverhältnismäßig hohe Antitoxinwerte auf (— < 25%); während hochwertige, reife Sera ihren Wert in der Regel lange Zeit fast unverändert beibehalten, nachdem sie sich in kurzer Zeit um ein geringes abgeschwächt haben; sie enthalten große Pseudoglobulin- und geringe Euglobulinmengen, letztere von sehr geringem Antitoxingehalt (— > 5%).

Die osmotische Trennung der Eiweißfraktionen vollzieht gewissermaßen den Spontanabschwächungsprozeß, indem die Pseudoglobuline von den Euglobulinen und Albuminen getrennt und damit weitere Umsetzungen innerhalb der Fraktionen und eine daraus folgende weitere Abschwächung verhindert werden.

Welche Rolle bei diesem Abschwächungsprozesse Antigenreste, die im Serum künstlich immunisierter Tiere wie in jedem einer Infektion oder Intoxikation ausgesetzten Organismus vorhanden sind, spielen, bleibt noch zu beantworten.

Die Isolierung des unveränderlichen antitoxischen Pseudoglobulins, welches bei hochwertigen Seren der alleinige Träger der antitoxischen Funktion ist, gestattet weiterhin, entsprechend dem geringen Eiweißgehalte dieser Fraktion, eine Konzentration auf mehr als den doppelten Wert des ursprünglichen Serums, wenn man eine 10proz. Lösung des Pseudoglobulins ansetzt.

Den Antitoxinen entsprechen die Tropine insofern, als auch sie in gleichem Verhältnisse in der Pseudoglobulinfraktion enthalten sind.



Das gleiche gilt von den Bakteriolysinen, welche bei den Pseudoglobulinen kein *Neisser-Wechsberg*sches Phänomen aufweisen, bei den Euglobulinen dagegen, zumal in höherer Konzentration eine typische Einengung der lytischen Breite in Erscheinung treten lassen.

Anders verhält es sich mit der Agglutination, welche zwar beim direkten Vergleich der Fraktionen stärker bei den Pseudoglobulinen auftritt, verhältnismäßig am stärksten aber bei den Euglobulinen erscheint, wenn die Fraktionen in gleicher Eiweißkonzentration miteinander verglichen werden.

Hinsichtlich der Komplementbindung scheinen die Verhältnisse ähnlich zu liegen wie beim Rotlauf-, Rotz- und Syphilisserum, bei welchen die spezifische Hemmung des Vollserums quantitativ im Euglobulin nachweisbar ist. Daß die Komplementbindung keinen Anhaltspunkt für die Wertbemessung bieten kann, geht schon daraus hervor, daß der sogenannte *Bordet*sche Antikörper an die Euglobuline gebunden ist, welche, zumal bei hochwertigen Seris, nur minimale Teilwerte aufzuweisen pflegen; nach vergleichenden Untersuchungen von Cholera- und Rotlaufseren haben hochwertige Sera gelegentlich geringe, mittelmäßige Sera hohen Komplementbindungswert; es scheint eher minderwertigen Seris hohe, hochwertigen dagegen geringe Bindungsfähigkeit zuzukommen.

## *III.*

Von gleich hohem theoretischen wie praktischen Interesse mußte die Zerlegung von bakteriellem Eiweiß und Toxinen erscheinen, zu welchem Zwecke man Bakterienaufschwemmungen von Kulturen auf festen Nährböden oder Bouillonkulturen verwenden kann.

Die üblichen Verfahren zur Darstellung von Antigenen, die Abtötung durch Wärme oder durch Antiseptica sind äußerst eingreifend und schädigend.

Eine Trennung verschiedener antigener Substanzen durch chemische Eingriffe (z. B. Lösung von Lipoiden) hat zu eindeutigen Resultaten nicht geführt. Sie wird methodisch angewendet zur Darstellung von geeigneten Extrakten zur Komplementbindung.

Dem gleichen Zwecke dient die Extraktion der Bakterienleiber durch Schütteln mit destilliertem Wasser (*Wassermann*). Das mechanische Aufschließen der säurefesten Bacillen zur Tuberkulindarstellung gehört hierher sowie die Aussalzung von Toxinen durch Ammonsulfat.

Die Dialyse endlich ist zur Darstellung der antigenen Substanz herangezogen worden und hat gezeigt, daß sich auf diesem Wege das Toxin zur Ausfällung bringen läßt, während das Zentrifugat zwar noch hohe spezifische Eigenschaften aufweist, aber nachweislich kein Toxin mehr enthält, Antitoxin nicht mehr erzeugt (z. B. Choleratoxin).

Bisher sind Diphtherie-, Tetanus-, Dysenterietoxin und Choleratoxin elektro-osmotisch behandelt worden. Sie zeigen dabei folgendes Verhalten: Im isoelektrischen Punkte kommt es zu einer Ausfällung des wirksamen Toxins. Das Präcipitat enthält zwar nur noch einen Bruchteil der Giftwirkung, reagiert aber qualitativ (Giftbindung) wie das Ausgangsmaterial und ist zur Erzeugung von Antitoxin allein geeignet.

Das Zentrifugat ist frei von Toxin und ohne antigene Wirkung in dieser Hinsicht, erzeugt aber bakteriolytische und komplementbindende sowie agglutinierende Sera.

Bemerkenswert ist in theoretischer Beziehung das parallele Verhalten der spezifischen Gifte, welche im elektrischen Strom eine beschleunigtere Abschwächung erfahren, als welcher sie sonst im Laufe der Zeit zu unterliegen pflegen, und der Sera, welche gewissermaßen den Prozeß der Spontanabschwächung durch die Abscheidung des Euglobulins beschleunigt vollziehen.

Toxine und Euglobuline als hydrophobe Eiweißkörper legen durch dieses Verhalten eine engere Beziehung im Mechanismus der Giftbindung und des Giftabbaues nahe. Wahrscheinlich wird erstens die Spontanabschwächung von Giften, welche im Laufe kürzerer oder längerer Zeit bis auf Spuren erfolgt, in der Toxin-Antitoxinbindung nur eine zeitliche Beschleunigung auf Grund physikalischer Einstellung erfahren. Zum anderen aber muß das Verhalten unreifer Sera in der Fraktionsverschiebung zugunsten des Euglobulins die Annahme gestatten, daß das noch antitoxinschwache Serum nicht nur größere Quanten von Eiweiß zur Bindung gleicher Toxinmengen und mehr Zeit zu deren Isolierung braucht, sondern auch in der Regel noch verfügbares Antigen enthält.

Die Anwendung des elektro-osmotischen Verfahrens zum Studium der Antigendarstellung dürfte weiterhin von besonderem Interesse bei den Septicämieerregern sein, mit welchen eine aktive Immunisierung, zumal empfänglicher Versuchstiere, mit abgetöteten Bacillen schwer oder gar nicht durchzuführen, eine geeignete sichere Virulenzherabsetzung der lebenden Erreger aber nicht möglich ist.

Es wurde zu diesem Zwecke der Rotlaufbacillus gewählt und festgestellt, daß eine Abtötung im elektrischen Strom sicher gelingt. Nach einem kurzen Stadium des Überlebens gramnegativer Rotlaufstäbchen, welche diese Eigenschaft übrigens in der Kultur nicht dauernd behalten, auch an infektiösem Vermögen nicht nachweislich abnehmen, tritt der Tod der Kultur ein. Der entstandene Niederschlag enthält Bakterien und Trümmer, welche sich nach Gram und mit Anilinfarben meistens nicht mehr färben, infolge der durch den elektrischen Strom bewirkten Plasmolyse.

Gelöst und in geeigneten Mengen Mäusen einverleibt, erzeugt das vollkommen ungiftige Präcipitat aktiven Schutz wie gelegentlich die Serovaccination, wenn diese zu latenter Infektion führte.



Mit dem gelösten lyophoben Bakterieneiweiß wurden Tiere zum Zwecke der Serumdarstellung erfolgreich immunisiert.

Mit dem Zentrifugat läßt sich nicht aktiv immunisieren; dagegen ist es als Antigen zur Komplementbindung geeignet.

Die methodischen Vorteile, die sich für die weitere Bearbeitung von Antigenfragen in theoretischer und praktischer Hinsicht ergeben, sind folgende:

1. Es gelingt, die Erreger auf elektro-osmotischem Wege mit Sicherheit abzutöten.

2. Die Abtötung erfolgt ohne thermische oder chemische Einwirkung, gegen welche bakterielle Antigene besonders empfindlich sind.

3. Die Einwirkung des elektrischen Stromes, selbstverständlich nur bei Verwendung geeigneter Diaphragmen, führt mit fortschreitender Entsalzung der Bakterien ohne mechanische Zertrümmerung zur Plasmolyse.

4. Die Präcipitation des spezifischen Bakterienantigens gestattet, eine beliebige Konzentration in Lösung und damit zur Immunisierung in Anwendung zu bringen, was für die Darstellung geeigneter Impfstoffe von Wichtigkeit ist.

5. Zentrifugat und Präcipitat lassen sich in antigener Beziehung untersuchen, dazu auch durch Vorschaltung geeigneter Anoden- und Kathodenräume, die abwandernden Eiweißabbauprodukte und ihre Beziehungen zum Antigen in toxikologischer Hinsicht feststellen.

Die Versuchsprotokolle zu den in vorstehendem zusammengestellten Ergebnissen sollen demnächst in dieser Zeitschrift veröffentlicht werden.



(Aus dem hygienischen Institut der Universität Basel [Vorsteher: Prof. *Doerr*].)

# Studien zum Bakteriophagenproblem.

1. Mitteilung.

## Zeitliche und quantitative Beziehungen zwischen Bakterienvermehrung und Zunahme des lytischen Agens*).

Von

**R. Doerr** und **W. Grüninger.**

Mit 4 Textabbildungen.

Die hier mitgeteilten Untersuchungen beschäftigen sich mit dem Phänomen der *Bakteriophagie* oder der *übertragbaren Lyse.*

Man darf wohl heute voraussetzen, daß die meisten Mikrobiologen den Ablauf solcher Vorgänge selbst beobachtet haben und daß sie die Grundzüge der einschlägigen Versuchstechnik aus eigener Erfahrung kennen; zum mindesten hat aber das außerordentlich starke und allgemeine Interesse, welches das Bakteriophagenproblem beansprucht, dazu genötigt, die Literatur eingehender durchzustudieren, wozu *d'Hérelles* ausgezeichnete Monographie „Le bactériophage, son rôle dans l'immunité" und mehrere in letzter Zeit erschienene Übersichtsreferate (*Wilburt C. Davison, Doerr* u. a.) bequeme Gelegenheit boten. Es erscheint uns daher überflüssig, unseren eigenen experimentellen Ergebnissen einleitende Bemerkungen vorauszuschicken, welche den Stand der bisher ermittelten Tatsachen nochmals resümieren oder die von *Twort, d'Hérelle* und ihren Nachfolgern angewendeten Methoden erneut beschreiben; auf eine Diskussion der Theorien über die Natur der Bakteriophagen (übertragbaren Lysine) möchten wir uns aber erst einlassen, bis wir in der Lage sind, die Resultate unserer Analysen in die Urteilsbildung mit einzubeziehen.

Nur über die *quantitative Bestimmung der Bakteriophagen*, welche in den folgenden Versuchsanordnungen eine wichtige Rolle spielt, dürften einige Erklärungen am Platze sein. Wie *Doerr* an anderer Stelle ausgeführt hat, stehen für diesen Zweck zwei Verfahren zur Disposition: 1. *die Zählung der kreisrunden, anscheinend bakterienfreien Flecke (tâches vierges oder tâches stériles)*, welche sich in einem zusammenhängenden Bakterienrasen aus einer bestimmten Menge einer auf ihren Bakteriophagengehalt zu untersuchenden Flüssigkeit entwickeln und

*) Vorgetragen auf der 103. Versammlung der schweizerischen naturforsch. Gesellschaft in Bern am 23. August 1922.





2. die *Dilutionsmethode*, welche jene äußerste Grenzverdünnung der zu prüfenden Probe zu ermitteln trachtet, in welcher der charakteristische Effekt der Bakteriolyse gerade noch zustande kommt.

Das erstgenannte Prinzip, dessen Verwendbarkeit schon *Twort* erkannt hatte, wurde von *d'Hérelle* in größtem Umfange zu Titrationen des Bakteriophagengehaltes flüssiger Substrate herangezogen und beherrschte dann in der Folgezeit so gut wie ausschließlich das Feld (*Bail*, *Watanabe*, *Otto*, *Munter* und *Winkler*, *C. Prausnitz* u. v. a.). *D'Hérelle*, der als Ursache der Bakteriophagie einen in den Bakterien parasitierenden Ultramikroben („Bacteriophagum intestinale") annimmt, betrachtet die im Bakterienrasen ausgesparten Flecke als *Kolonien* dieses submikroskopischen (filtrierbaren) Keimes und sieht daher in dem Verfahren nur eine spezielle Nutzanwendung der den Bakteriologen längst geläufigen Bestimmung von Keimzahlen durch Zählung der auf geeigneten Nährböden auftretenden Ansiedelungen; dem Nährboden der Bakteriophagen entspricht in dieser Auffassung die kohärente Bakterienschicht, in welcher die erwähnten hellen Stellen zu beobachten sind. *D'Hérelles* Hypothese über die Natur des bakteriophagen Agens wird allerdings vielfach bestritten; aber die Brauchbarkeit der Zählung der Tâches stériles hängt schließlich nicht von der Richtigkeit dieser Hypothese ab, sondern von der Beantwortung von Fragen, die bei allen neu einzuführenden Meßmethoden aufgeworfen und gelöst werden müssen. Im Vordergrunde steht natürlich die Entscheidung, ob sich aus dem gleichen Volum einer bestimmten bakteriophagen Flüssigkeit immer gleich viel kahle Flecke entwickeln oder ob die Zahl der letzteren auch dann schwankt, wenn wir die Bedingungen der Versuche möglichst gleich zu gestalten trachten. Um welche Bedingungen es sich hier handeln kann, ergibt sich aus der genaueren Zergliederung des Verfahrens in die einzelnen Akte. Die meisten der zu untersuchenden Proben enthalten hohe Konzentrationen des bakteriophagen Agens; würde man sie unverdünnt mit einer Suspension von lösbaren Bakterien vermengen und das Gemisch auf eine Agarplatte ausbreiten, so bliebe das Bakterienwachstum scheinbar überhaupt aus, es käme, um die Ausdrucksweise dem *d'Hérelle*schen Vorstellungskreis anzupassen, zur Ausbildung eines „Bakteriophagenrasens". Um isolierte und zählbare sterile Flecken zu erzielen, ist man daher genötigt, *die zu untersuchende Probe fortschreitend zu verdünnen*, z. B. auf das 10-, 100-, 1000fache usw., je 0,1 ccm dieser Verdünnungen mit 1,0 ccm einer Bouillonaufschwemmung frischer lebender Bakterien zu vermengen und je 1,0 ccm dieser Gemische auf der Oberfläche von Agarplatten mit Hilfe eines Glasspatels auszubreiten bzw. „gründlich bis zur Trockne zu verreiben"; die Zahl der bakterienfreien Stellen muß dann natürlich auf 1 ccm umgerechnet werden. Ob man sich nun streng

an diese der Publikation von *C. Prausnitz* entnommenen Angaben hält oder den Vorgang nach dieser oder jener Richtung etwas modifiziert, stets wird das Endergebnis beeinflußbar sein: 1. durch jene Fehler, welche durch die fortschreitende Verdünnung bedingt sein können; 2. durch die verschiedene Beschaffenheit der Bakterienemulsion; 3. durch die mehr oder minder gleichmäßige Ausbreitung des Bakterien-Bakteriophagengemenges auf der Agarfläche; 4. durch den Feuchtigkeitsgrad dieser Fläche und 5. durch jene Eigenschaften des Nähragars, von welchen die Wachstumsschnelligkeit und der Stoffwechsel der aufgetragenen Bakterien abhängt. Der Verdünnungsfehler soll an einer anderen Stelle dieser Mitteilung erörtert werden; vorläufig wollen wir uns nur mit der Bedeutung der anderen Faktoren befassen. Nach den Untersuchungen von *d'Hérelle* scheint sie minimal zu sein. Dieser Autor bekam immer dieselbe Zahl durchsichtiger steriler Flecke in der Bakterienschicht, gleichgültig, ob er dünnere oder dichtere Aufschwemmungen von Bakterien auf die Platten brachte, vorausgesetzt, daß in der Aussaat stets die gleiche Menge derselben Bakteriophagenlösung enthalten war; wurde dagegen die letztere auf das Doppelte, Dreifache, Zehnfache erhöht, so stieg auch die Zahl der Tâches stériles im gleichen Ausmaße. Gerade in diesen Verhältnissen und speziell in dem Umstande, daß die bakterienfreien Bezirke bei Erhöhung der Bacillenaussaat nicht zunahmen, erblickte *d'Hérelle* ein wichtiges Argument für seine Ansicht, daß das lytische Agens nicht aus den Bakterien stammen könne, sondern ein selbständiger lebender Mikroorganismus sein müsse. Aber *Gratia*, welcher die angeführten Versuchsanordnungen von *d'Hérelle* nachprüfte, kam zu entgegengesetzten Resultaten. Er fand, daß die Zahl der sich entwickelnden bakterienfreien Stellen durchaus nicht die gleiche ist, wenn man dieselbe Menge Bakteriophagenlösung zu Bacillensuspensionen von verschiedener Dichte zusetzt, sondern daß sie zunächst mit der Zahl der Bacillen ansteigt, um schließlich — von einem bestimmten Optimum an — wieder abzunehmen. In diesem Punkte herrscht also keineswegs jene Klarheit, welche es rechtfertigen würde, auf Titrationen des „Bakteriophagengehaltes" von Flüssigkeiten durch Zählung der Tâches stériles weitgehende Schlüsse aufzubauen; wenigstens wäre vorläufig zu verlangen, daß für Meßzwecke Bakteriensuspensionen von annähernd gleicher und bekannter Dichte benützt werden. Ferner laboriert das Verfahren an den bekannten Mängeln der „Schmierplattentechnik", die man in der Bakteriologie — soweit es sich um Keimzählungen handelt — zu vermeiden sucht, indem man auf das ursprüngliche, von *R. Koch* angegebene „Plattengießen" mit bereits beimpfter Gelatine zurückgreift; dieser Ausweg ist für den Bakteriophagennachweis aus mehrfachen Gründen versperrt und man muß daher wohl oder übel alle Nachteile





in Kauf nehmen, welche eine ungleichmäßige Verteilung des Materials auf den Agarflächen mit sich bringt. Endlich wird die Feuchtigkeit des Nährbodens und seiner Oberfläche das Entstehen der Tâches stériles beeinflussen. Schon *Eliava* und *Pozerski* haben Beobachtungen veröffentlicht, aus denen hervorgeht, daß die Bakterien auf relativ trockenen Agarflächen gegen die Einwirkung der Bakteriophagen geschützt sind; wenn sie ein Gemenge von Shigabacillen und einer korrespondierenden Bakteriophagenlösung auf der Fläche eines stark eingetrockneten Schrägagarröhrchens ausbreiteten, so blieb die beimpfte Fläche in ihrer ganzen Ausdehnung steril, *nur auf dem am stärksten ausgetrockneten oberen Abschnitt entwickelten sich kleine Bakterienkolonien.* Daß also der Wassergehalt des Nähragars, das ausgepreßte Kondenswasser, die bei der Beimpfung mitaufgetragene Bouillon nicht ohne Bedeutung sein werden, läßt sich leicht ermessen.

Überlegungen und Erfahrungen dieser Art veranlaßten uns, *der Dilutionsmethode den Vorzug zu geben*, um so mehr als ja auch den Agaraussaaten zwecks Darstellung der Tâches stériles in der Mehrzahl der Fälle eine fortschreitende Verdünnung der zu untersuchenden Probe vorangehen muß. Die Notwendigkeit der Verdünnung haben somit beide Verfahren miteinander gemein und die Differenz besteht nur in der besonderen Art, wie das bakteriophage Agens in den höheren bzw. in den terminalen Verdünnungen nachgewiesen wird. Bei der Dilutionsmethode geschieht das so, daß man die Verdünnungen mit Nährbouillon anlegt, in jede Verdünnung ein gleichgroßes Quantum (z. B. eine Öse 16stündige Bouillonkultur) der empfindlichen Bakterienart einsät und nun feststellt, welches Röhrchen bei der nachfolgenden Bebrütung noch klar bleibt oder sich nach anfänglicher Trübung wieder aufhellt. Sind in jeder Eprouvette 9 ccm sterile Bouillon vorhanden und setzt man der ersten Eprouvette einer Auswertungsreihe 1 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit zu, der zweiten Eprouvette 1 ccm aus der ersten, der dritten 1 ccm aus der zweiten usf., so enthalten die Röhrchen:

$0{,}9 \times 10^0$, $0{,}9 \times 10^{-1}$, $0{,}9 \times 10^{-2}$, $0{,}9 \times 10^{-3}$, $0{,}9 \times 10^{-4}$ usf. ccm

der zu titrierenden Probe, können also nach dem Vorschlage von *Werthemann* kurz durch die Exponenten (0, 1, 2, 3, 4 usf.) mit Hinweglassung der selbstverständlichen Minuszeichen charakterisiert werden. Der Exponent der Grenzverdünnung, in welcher noch Bakteriolyse zu beobachten ist, gibt das Maß für die gesuchte Bakteriophagenkonzentration des Ausgangsmateriales und wird von *Werthemann* als Lysinexponent ($= e_L$) bezeichnet. Eine bakteriophagenhaltige Flüssigkeit vom $e_L = 8$ wäre also so konzentriert, daß noch $0{,}9 \times 10^{-8}$ ccm (in 9 ccm Nährbouillon enthalten) eine bestimmte Einsaatmenge empfindlicher Bacillen lösen. Es braucht wohl nicht weiter ausgeführt



zu werden, daß die Anwendbarkeit der eben geschilderten Dilutionsmethode nicht davon abhängt, ob das bakteriophage Agens in den Flüssigkeiten, die es enthalten, wie irgendein hydrophiles Kolloid z. B. wie Serumglobulin verteilt ist oder ob ihm ein geringerer Grad von Dispersität, der etwa einer feinen Suspension entsprechen würde, zukommt. Eine „Suspension" läßt sich ebenso wie eine „Lösung" so weit verdünnen, bis die Konzentration des dispergierten, wirksamen Stoffes unterschwellig wird; auch für den Fall, daß das Dispersum aus lebenden, vermehrungsfähigen Einzelligen besteht, hat natürlich das Ergebnis einer Titration durch Verdünnung einen Sinn, indem der reziproke Wert der im Grenzröhrchen enthaltenen Menge Ausgangsmaterial die Zahl der entwicklungsfähigen Keime im Kubikzentimeter in guter Annäherung angibt. Die Dilutionsmethode ist — abgesehen von dieser Vielseitigkeit — auch dadurch ausgezeichnet, daß sie das Konstanthalten der Bedingungen, an welche der Ablauf der eigentlichen Bakteriophagenreaktion und damit der Nachweis des bakteriophagen Agens gekettet ist, sehr erleichtert. Verwendet man immer gleich hergestellte Bouillon von derselben H-Ionenkonzentration und beimpft man die Verdünnungen der Auswertungsreihen — wie bereits hervorgehoben — mit gleichgroßen Mengen lebender Bakterien, so gibt das gleiche Lysin gegen den gleichen Stamm geprüft tatsächlich völlig identische Werte (Lysinexponenten); geht man von einer beliebigen (bekannten) Dilution eines ausgewerteten Lysins aus, so entspricht ihr Lysinexponent — von seltenen und geringfügigen Abweichungen abgesehen — ausnahmslos der errechneten Ziffer. Die nachstehenden Protokolle bringen hierfür genügende Belege.

Außer den erwähnten besitzen noch zwei Umstände für die Exaktheit der Bakteriophagenauswertung durch Dilution Bedeutung. Erstens muß man dafür sorgen, daß sich die Einwirkung der hergestellten Verdünnungen auf die Bakterien wenigstens annähernd stets *bei der gleichen Temperatur*, und zwar bei 37° C, vollzieht. Am besten wäre es, die Verdünnungen bzw. die Eprouvetten, welche dieselben enthalten, in ein Wasserbad von der angegebenen Temperatur einzustellen und die Beimpfung mit Bakterien erst vorzunehmen, wenn sich der Inhalt der Reagensgläser ebenfalls auf 37° erwärmt hat. Da uns keine Vorrichtung zu Gebote stand, welches das Unterbringen von 100 und mehr Eprouvetten in Wasser von konstanter Wärme erlaubt hätte, behalfen wir uns mit einer Brutkammer, die in den oberen Anteilen ziemlich gleichmäßig temperiert war, und lasen die Resultate zur Kontrolle mehrmals (nach 6, 12 und 24 Stunden) ab.

Wichtiger noch ist die strenge Beachtung der Vorschrift, *daß man bei der Herstellung der Verdünnungen des Ausgangsmateriales stets neue, sterile Pipetten zu benutzen hat oder korrekter ausgedrückt, daß man für*

*jeden Dilutionsakt eine besondere Pipette verwendet.* In der serologischen Technik verfährt man, um Zeit und Glaswaren zu sparen, so, daß man *mit einer einzigen Pipette* alle Verdünnungen eines Substrates, z. B. eines antikörperhaltigen Serums anfertigt; zweifellos involviert dieses Vorgehen Fehler, die man aber, wo es nicht auf ganz besonders exakte Messungen ankommt, vernachlässigen darf. Ganz anders gestalten sich jedoch die Verhältnisse bei einer Bakteriophagentitration.

### *Versuche.*

Eine konzentrierte bakteriophagenhaltige[1]) Bouillon wird nach der Dilutionsmethode ausgewertet, und zwar viermal; das erste- und drittemal wird für jede Verdünnungsprozedur eine frische Pipette verwendet, das zweite- und viertemal werden alle Verdünnungen der betreffenden Auswertungsserie mit einer einzigen Pipette (1 ccm-Auslaufpipette) hergestellt. Hervorzuheben ist, daß die Auswertungen 1 und 2 am gleichen Tage erfolgten, daß somit die gleiche Colibouillonkultur zur Einsaat benutzt wurde; die Serien 3 und 4, am nächsten Tage aufgestellt, waren mit einer anderen Kultur des nämlichen Stammes beschickt. In der Tabelle entspricht jede Vertikalreihe einer Auswertungsserie; die Null besagt, daß das betreffende Röhrchen bei der endgültigen Ablesung klar, nicht durch Bakterien getrübt war, daß also Bakteriolyse eingetreten sein mußte, das Pluszeichen bedeutet: starke Trübung der Bouillon infolge von Vermehrung der eingesäten Keime oder Ausbleiben der Bakteriolyse. Die Ziffern am linken Rand geben in Kubikzentimetern an, welche Menge der titrierten Bakteriophagenbouillon die Eprouvetten der entsprechenden Horizontalreihe rechnungsgemäß enthielten.

| Lysinmenge: | Auswertungen I. | II. | III. | IV. |
|---|---|---|---|---|
| 1,0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $10^{-1}$ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $10^{-2}$ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $10^{-3}$ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $10^{-4}$ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $10^{-5}$ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $10^{-6}$ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $10^{-7}$ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $10^{-8}$ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $10^{-9}$ | + | 0 | + | 0 |
| $10^{-10}$ | + | 0 | + | 0 |
| $10^{-11}$ | + | 0 | + | 0 |
| $10^{-12}$ | + | 0 | | 0 |
| $10^{-13}$ | | 0 | | 0 |
| $10^{-14}$ | | 0 | | 0 |
| $10^{-15}$ | | + | | 0 |
| $10^{-16}$ | | | | 0 |
| $10^{-17}$ | | | | 0 |
| $10^{-18}$ | | | | 0 |
| 0 (Kontrolle): | + | + | + | + |

[1]) Alle in dieser Mitteilung wiedergegebenen Experimente wurden mit einem „Colibakteriophagen“ und einem zugehörigen „sensiblen Colistamm“ ausgeführt. Beide verdanken wir der Liebenswürdigkeit von *J. Bordet* (Brüssel).





Die beiden mit ständigem Pipettenwechsel bewerkstelligten Titrationen ergaben, wie man sieht, den gleichen Lysinexponenten (8), obwohl sie an verschiedenen Tagen und mit verschiedenen Colikulturen angesetzt worden waren. In den mit je einer Pipette hergestellten Dilutionsreihen ging die Bakteriolyse dagegen viel weiter und nicht jedesmal gleich weit. In der 4. Auswertungsreihe war auch mit $10^{-18}$ ccm die Grenze noch; immer nicht erreicht, ja es kann sich ereignen, daß in solchen Serien klare und getrübte Röhrchen ganz unregelmäßig alternieren.

Fragt man sich, worauf diese enormen Differenzen zurückzuführen sind, so scheint es rationell, nach Analogien Umschau zu halten. Nun liegen ähnliche Beobachtungen bereits vor. *Doerr* und *Berger* verdünnten eine Trypanosomenemulsion, welche in der *Bürker*schen Zählkammer ausgezählt worden war, fortschreitend im Verhältnis von 1 : 9 mit physiologischer NaCl-Lösung derart, daß die Pipette erst nach jedem zweiten Verdünnungsakt gewechselt wurde. Von jeder Verdünnung wurde 1,0 ccm einer weißen Maus intraperitoneal eingespritzt und festgestellt, ob und wann die Tiere an der Naganainfektion erkrankten und verendeten. Es zeigte sich, daß die Infektiosität der injizierten Mengen der fortschreitenden Verdünnungen keineswegs erlosch, sobald ihr rechnungsmäßiger Trypanosomengehalt unter 1 herabsank. Vielmehr fielen die Infektionsversuche noch mit Verdünnungen positiv aus, welche im Kubikzentimeter nur mehr 0,8, 0,08 oder noch weniger Trypanosomen enthalten sollten; und wahrscheinlich wären die Unterschiede zwischen rechnungsgemäßer Erwartung und tatsächlichem Ergebnis noch weit bedeutender gewesen, wenn die Pipette von der Stammemulsion bis zur höchsten Verdünnung die gleiche geblieben wäre.

An diese Erfahrung anknüpfend haben wir Colibouillonkulturen fortschreitend mit Bouillon im Verhältnis von 1 : 9 verdünnt, entweder mit ständigem Pipettenwechsel oder mit einer einzigen Pipette und die erhaltenen Verdünnungen in den Thermostaten gebracht, um zu sehen, ob und bis zu welcher Grenze noch Wachstum von Colibakterien eintritt. Die folgende Tabelle zeigt das Ergebnis, welches von dem der obigen Bakteriophagentitrationen kaum abweicht. (+ bedeutet hier Bakterienwachstum, 0 Sterilbleiben der Bouillonverdünnung; die Ziffern geben in Kubikzentimetern die Menge Colibouillonkultur an, welche die betreffenden Dilutionen rechnungsgemäß enthalten sollten.) Die Reihen 1 und 2 wurden mit gewechselten Pipetten hergestellt, Reihe 3 mit einer einzigen; 2 und 3 sind Verdünnungen derselben Colibouillon, Reihe 1 betrifft eine andere Kultur.



| | I | II | III |
|---|---|---|---|
| 1,0 | + | + | + |
| $10^{-1}$ | + | + | + |
| $10^{-2}$ | + | + | + |
| $10^{-3}$ | + | + | + |
| $10^{-4}$ | + | + | + |
| $10^{-5}$ | + | + | + |
| $10^{-6}$ | + | + | + |
| $10^{-7}$ | + | + | + |
| $10^{-8}$ | + | 0 | + |
| $10^{-9}$ | 0 | 0 | + |
| $10^{-10}$ | 0 | 0 | + |
| $10^{-11}$ | 0 | 0 | + |
| $10^{-12}$ | 0 | 0 | + |
| $10^{-13}$ | | | + |
| $10^{-14}$ | | | + |
| $10^{-15}$ | | | + |
| $10^{-16}$ | | | + |
| $10^{-17}$ | | | + |

Überlegt man nun, worauf der beschriebene Pipetteneffekt beruhen kann, so bereitet die Antwort bei den Trypanosomen und Bakterien keine Schwierigkeiten. Offenbar bleiben beim Ausfließen des Inhaltes aus dem Lumen der Pipette zahlreiche lebende Zellen an der Innenwand der Glasröhre kleben, wobei die Gestalt der Elemente, das Verhalten der Anhangsorgane (Geißeln), die Schmiegsamkeit des Zellkörpers und die Viscosität der Oberfläche mitwirken; mit den erneuten Füllungen der Pipette werden dann einzelne Mikroben von der Unterlage wieder abgeschwemmt und geraten so auch in sehr hohe Verdünnungen. Da Trypanosomen und Bakterien vermehrungsfähig sind, so wird natürlich ein einziges lebendes Exemplar genügen, um bei der betreffenden Verdünnung einen positiven Ausschlag (Infektion oder Bakterienwachstum) zu liefern. Auch wird es möglich sein, daß in eine bestimmte Verdünnung keine Zelle hineinrutscht, wohl aber in die nächsthöhere und daß dann paradoxerweise negative und positive Resultate gegen das Ende einer fortschreitenden Verdünnungsserie abwechseln. Darf man nun ohne weiteres die Nutzanwendung auf das Bakteriophagenproblem machen? Darf man insbesondere den Schluß ziehen, daß die Träger der bakteriophgaen Wirkungen kleinste Elementarorganismen sein müssen, weil sie sich gegenüber dem „Pipettenfehler“ genau so verhalten wie Trypanosomen oder Bakterien? U. E. ist da die äußerste Vorsicht geboten. Bei allen Versuchsanordnungen, bei denen Bakteriophagen einen Faktor repräsentieren, und bei sämtlichen Folgerungen, die man aus dem Ausfall solcher Experimente ableitet, muß man berücksichtigen, daß die sog. Bakteriophagen-(Lysin-)Lösungen keineswegs eine Verteilung des wirksamen Agens in einer homogenen Flüssigkeit repräsentieren, sondern daß in



denselben zufolge der Art ihrer Darstellung fast immer lebende oder tote Bakterien oder corpusculäre Zerfallsprodukte von Bakterien vorhanden sind. Stellen wir uns vor, daß der bakteriophage Stoff an diese Partikel adsorbiert wird oder dieselben durchtränkt — eine Annahme, die bei den Wechselbeziehungen von Bakterien und Bakteriophagen viel für sich hat —, dann kann sehr leicht eine geringere Dispersität desselben vorgetäuscht werden, auch dann, wenn er in Wahrheit kolloidal gelöst ist. Das gilt natürlich nicht nur für die geschilderten Erscheinungen beim Verdünnen eines „Lysins", sondern auch für Beobachtungen, die beim Sedimentieren, Zentrifugieren, flächenhaften Ausbreiten von derartigen bakteriophagenhaltigen Bouillons gemacht werden. Es erscheint daher notwendig, Untersuchungen über den Dispersitätsgrad der Bakteriophagen nur mit Substraten anzustellen, aus denen man Bakterien und Bakterientrümmer so weit als möglich eliminiert hat.

Wie das geschehen kann und wie sich dann die Dilutionsphänomene gestalten, gehört nicht streng zu unserem Thema. Um nicht von demselben abgelenkt zu werden, verzichten wir vorläufig auf die definitive Erklärung des Pipetteneffektes und begnügen uns damit, auf seine eminente Bedeutung für die Exaktheit der Bakteriophagentitrationen hinzuweisen.

Nunmehr wollen wir uns der Untersuchung zuwenden, wie sich die zeitlichen und quantitativen Verhältnisse bei der Bakteriophagenvermehrung in vitro gestalten und welche Beziehungen zwischen ihnen und der Vermehrung bzw. dem Absterben der eingesäten Bakterien bestehen.

Durch diese Fragestellung war die Versuchsanordnung von vornherein bis zu einem gewissen Grade festgelegt. Mit Watte verschlossene Erlenmeyerkolben, die 200 ccm Bouillon von geeignetem $p_H$ enthielten, wurden mit einer solchen Quantität einer konzentrierten Bakteriophagenlösung versetzt, daß eine möglichst niedrige, aber noch gut titrierbare Konzentration resultierte. Zumeist hatte dann die Bouillon im Kolben einen Lysinexponenten von 1 oder von 2, was natürlich jeweils — um den Ausgangswert zu kennen — konstatiert werden mußte. Sodann kam der Kolben in ein Wasserbad von bestimmter Temperatur und wurde, sobald der Wärmeausgleich zwischen Inhalt und umgebendem Wasser erfolgt war, mit einer Öse einer 16stündigen Colibouillonkultur beimpft. Von Zeit zu Zeit wurden, ohne den Kolben aus dem Wasserbad herauszuheben, Proben mit Pipetten entnommen und in zwei Richtungen untersucht:

a) auf ihren *Bakteriophagengehalt* mit Hilfe der Dilutionsmethode und

b) auf ihren *Gehalt an lebenden Bacillen* durch Gießen von Gelatinezählplatten mit abgemessenen Bouillonmengen.



Da die zu prüfende Bouillon stets das bakteriophage Agens (am Schlusse eines derartigen Experimentes meist in maximaler Konzentration) enthielt, so war die Bestimmung der Keimzahlen[1]) selbstverständlich an die Voraussetzung gebunden, daß sich alle lebenden oder richtiger ausgedrückt, alle *normal vermehrungsfähigen* Bacillen auch in einer bakteriophagenhaltigen Gelatine zu makroskopisch oder bei Lupenbetrachtung sichtbaren Kolonien zu entwickeln vermögen. Vorversuche, auf welche wir in einer gesonderten Mitteilung zurückkommen werden, hatten gelehrt, daß diese Voraussetzung zutrifft, allerdings nicht unter allen Umständen. Zunächst darf die Gelatine nicht einfach durch Nähragar substituiert werden, etwa in der Absicht, die Zählungen der Kolonien früher vornehmen zu können; man würde sich sofort überzeugen, daß die antilytische Wirkung des Agars nur im Bereiche niederer Lysinkonzentrationen jener der Gelatine gleichkommt, während hohe Konzentrationen durch Gelatine besser paralysiert werden als durch Agar. Schließlich versagt auch das antilytische Vermögen der Gelatine, man hat es aber in der Hand, diesen störenden Faktor weitgehend auszuschalten, wenn man zu jenen Zeiten,

[1]) In den Compt. rend. de la Soc. de Biologie **86**, Nr. 11, 1922 kündigt auch *A. Saldanha* die Veröffentlichung von Untersuchungen an, welche sich mit dem Einfluß der Zahl der Bakterien und der Menge des lytischen Prinzips auf den Ablauf der *d'Hérelle*schen Bakteriolyse beschäftigen sollen. Aus der vorläufigen Mitteilung ist zu entnehmen, daß *Saldanha* die Zahl der Bakterien teils nach dem Grade der Transparenz der Bouillon, teils nach dem Ergebnis der Aussaat kleiner Bouillonmengen auf die *Oberfläche* von Agarplatten schätzte und daß er das lytische Prinzip durch die Methode der „*tâches stériles*" nach vorausgegangener Erhitzung der Proben auf 60° C zu bestimmen versuchte. Die Versuchsanordnung war somit von der von uns benützten in wesentlichen Punkten verschieden. Die kurz resümierten Resultate weichen dementsprechend ebenfalls in einigen Belangen, darunter auch in wichtigen, von den in diesen „Studien" publizierten ab, in anderen zeigen sie Übereinstimmung. *Saldanha* fand (gleich anderen Untersuchern), daß der Lyse eine Bakterienvermehrung vorausgeht und daß sich an sie die Entwicklung der Sekundärkultur anschließt, Tatsachen, die sich übrigens schon aus der makroskopischen Beobachtung ergeben.

Weiter stellte aber *Saldanha* fest, daß die primäre, antilytische Vermehrung um so schwächer ist, je größer die Lysinmenge gewählt wird; bei großen Lysinmengen verläuft die Lyse rascher, endigt früher und die resistenten Bakterien der Sekundärkultur treten in kürzerer Zeit auf. Der *Vermehrung des Lysins* soll ein schon von *d'Hérelle* konstatiertes Verschwinden dieses Stoffes vorangehen; dann setzt die Zunahme ein, deren Maximum mit dem Eintritt der Lyse koinzidiert. Mit fortschreitender Lyse nimmt das Lysin ab, um schließlich parallel mit der Entwicklung der resistenten Bakterien der Sekundärkultur zu verschwinden. — In eine Kritik dieser Angaben, die uns erst nach Fertigstellung der vorliegenden Arbeit zu Gesicht kamen und in einen Vergleich mit unseren Resultaten kann, solange die ausführliche Publikation von *Saldanha* nicht vorliegt, natürlich nicht eingegangen werden. In der zitierten Notiz beschränkt sich *Saldanha* auf die tatsächlichen Befunde, ohne aus ihnen irgendwelche Schlüsse auf die Natur des Bakteriophagenphänomens abzuleiten.

zu welchen man hohe Lysinkonzentrationen der auf ihren Keimgehalt zu prüfenden Bouillon vermutet, nur kleine Volumina Bouillon in die Gelatine bringt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Keimgehalt in der Regel so bestimmt, daß 0,1 ccm der betr. Bouillon mit 10 ccm verflüssigter Gelatine vermengt zur Platte ausgegossen wurde; das ergibt eine 100fache Verdünnung des Lysins in der Gelatine oder bei einem Lysinexponenten 9 der Bouillon einen Exponenten 7 für die Gelatine. In so stark lysinhaltiger Gelatine macht sich jedoch der entwicklungshemmende Einfluß des Lysins doch noch geltend; sät man aber statt 0,1 ccm Bouillon nur 0,001 ccm oder noch weniger aus, dann fällt die Lysinwirkung weg und man bekommt höhere Keim-(Kolonien-)Zahlen. Wir haben später diesen Verhältnissen Rechnung getragen und mehrere Experimente mit der im angedeuteten Sinne modifizierten Technik der Bakterienzählung wiederholt; die dadurch involvierte Änderung der Ergebnisse war aber für die ursprünglich gezogenen Schlüsse belanglos oder ließ die denselben zugrunde gelegten Feststellungen in noch schärferer Ausprägung hervortreten.

Für die ersten Bestimmungen wählten wir eine Temperatur des Wasserbades, welche dem Wachstumsoptimum der Colibakterien entsprach und bei welcher auch die Bakteriolyse erfahrungsgemäß rasch und vollständig abläuft: *37° C.*

*Versuch.*

Die als Ausgangsmaterial verwendete, sicher bakterienfreie (1 Stunde auf 57° erhitzte) Bakteriophagenbouillon ergab bei der Titration folgende Reihe:

| | |
|---|---|
| 1,0 ccm | θ |
| $10^{-1}$ ,, | θ |
| $10^{-2}$ ,, | θ |
| $10^{-3}$ ,, | θ |
| $10^{-4}$ ,, | θ |
| $10^{-5}$ ,, | θ |
| $10^{-6}$ ,, | θ |
| $10^{-7}$ ,, | θ |
| $10^{-8}$ ,, | θ |
| $10^{-9}$ ,, | + |
| $10^{-10}$ ,, | + |

Der Lysinexponent betrug somit 8. Bevor aber noch die obige Verdünnungsserie mit Colibakterien beimpft und bevor daher der Titer des Lysins bekannt war, wurden dem Röhrchen $10^{-4}$ 2 ccm entnommen und zu einem Kolben zugesetzt, welcher 200 ccm Bouillon ($p_H = 7{,}65$) enthielt. Der Kolbeninhalt wurde gleichfalls titriert und lieferte das Ergebnis:

| | |
|---|---|
| 1,0 ccm | θ |
| $10^{-1}$ ,, | θ |
| $10^{-2}$ ,, | + |
| $10^{-3}$ ,, | + |

hatte also den Lysinexponenten 1, genau den Wert, den man in Anbetracht des Titers der Ausgangslösung erwarten mußte. Denn ein Kubikzentimeter aus der



Eprouvette $10^{-4}$ enthält — wie aus der Bezeichnung erhellt — $\frac{1}{100\,000}$ ccm Lysin, ein Kubikzentimeter im Kolben $\frac{1}{10\,000\,000}$ und da $\frac{1}{100\,000\,000}$ zur Lyse ausreicht (laut Auswertung), so mußte noch 0,1 ccm des Kolbeninhaltes lösend wirken, eine Wirkungsstärke, welche eben der Lysinexponent 1 ziffernmäßig ausdrückt.

Nun setzten wir den Kolben ins Wasserbad von 37°, beimpften ihn nach dem Temperaturausgleich mit 1 Öse 16stündiger Colibouillonkultur und entnahmen Proben zur Zeit $t = 0$ (d. h. unmittelbar nach dem Bakterienzusatz), ferner nach 15, 30, 45, 60, 90, 105, 120, 150, 180, 210 und 270 Minuten. Für jede Probe wurde der Lysinexponent und die Zahl der lebenden Colibakterien im Kubikzentimeter bestimmt. Tabellarisch zusammengestellt präsentieren sich die Resultate folgendermaßen:

| Abgelaufene Zeit: | Lysinexponent: | Bakterienzahl |
|---|---|---|
| 0 Minuten | 1 | 16 000 |
| 15 „ | 1 | 16 000 |
| 30 „ | 1 | 16 000 |
| 60 „ | 1 | 20 000 |
| 90 „ | 1 | 35 000 |
| 105 „ | 1 | 45 000 |
| 120 „ | 2 | 60 000 |
| 150 „ | 4 | 130 000 |
| 180 „ | 6 | 600 000 |
| 210 „ | 8 | 200 000 |
| 270 „ | 8 | 20 000 |
| 330 „ | > 9 | 75 000 |

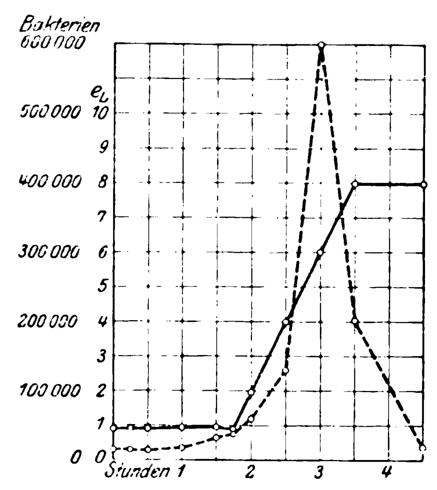



Abb. 1. Lysin- und Bakterienvermehrung in einer Bouillon vom $p_H = 7{,}65$. Der Lysinzunahme entspricht die ausgezogene, der Bakterienvermehrung die gestrichelte Linie; für erstere sind die Logarithmen der Konzentrationen, für letztere die Konzentrationen selbst als Ordinaten eingetragen. Zwei Teilstriche auf der Abszissenachse bedeuten 1 Stunde.

Die Ziffern für 330 Minuten sind insofern nicht ganz zuverlässig, als die Lysintitration bei dieser Probe nicht exakt und auch nicht vollständig ausgeführt wurde; sie sollen daher nicht erörtert werden. Der Rest der Tabelle wird klarer, wenn man die Lysinzunahme ebenso wie die Bakterienvermehrung als Funktionen der Zeit graphisch darstellt. Für die „Bakterienkonzentration", d. h. für die jeweils in der Volumeinheit vorhandenen lebenden Colikeime, kann man einfach die gefundenen Keimzahlen als Ordinaten auftragen; statt der Lysinkonzentrationen empfiehlt es sich, die Lysinexponenten, die Logarithmen der Konzentrationen, zu wählen, wodurch das Bild an Übersichtlichkeit gewinnt und die Betrachtung nicht gestört wird.

Tabelle und Kurve erlauben folgende Aussagen:

1. Daß sich die initiale Bakterienmenge und der Bakteriophagentiter während einer Zeitspanne nicht verändern, die dem bekannten Inkubationsstadium des Bakterienwachstums in frisch beimpften Bouillonkulturen („bacterial lag" der englischen und



amerikanischen Autoren) entspricht. Ein Bakterienuntergang (Lyse) findet während dieses Intervalles nicht statt; die Verhältnisse gestalten sich genau so, als wenn der Bakteriophage (das Lysin) gar nicht vorhanden wäre. Die Wachstumsinkubation erscheint auch nicht verlängert (vgl. *Penfold* und *Graham-Smith*).

2. Daß einige Zeit vor dem Nachweisbarwerden der Lysinzunahme eine Bakterienvermehrung einsetzt, welche dann in der Folge während des größten Teiles der Phase des Lysinanstieges anhält. Die aufsteigenden Schenkel beider Kurven sind zeitlich offensichtlich einander zugeordnet.

3. Daß das Absterben der Bakterien die Vermehrung erst überkompensiert, wenn der Bakteriophagentiter sein Maximum nahezu erreicht hat.

4. Daß in der letzten Phase des fast bis zur Sterilisation gehenden Bakterienzerfalles keine nachweisbare Erhöhung des Lysintiters statthat.

5. Daß die Lysinzunahme kontinuierlich (nicht, wie *d'Hérelle* angibt, schubweise) und äußerst rapide vor sich geht, indem sich die Konzentrationen in je 15 Minuten verzehnfachen; die Logarithmen der Konzentrationen liegen daher auf einer Geraden.

Das Experiment wurde mehrfach wiederholt und ergab — von kleinen Abweichungen abgesehen — die gleichen Resultate. Eine solche Wiederholung mag hier wiedergegeben werden, um über die Art und Größe der Differenzen Aufschluß zu bieten.

*Versuch.*

Das Ausgangsmaterial hatte den Lysinexponenten 9, d. h. $\frac{1}{1\,000\,000\,000}$ ccm (in 9 ccm Bouillon) vermochte noch gerade Bakteriophagie bis zur Klärung der Nährflüssigkeit hervorzurufen, wenn eine Öse 16stündiger Colibouillonkultur eingeimpft wurde.

Vom Röhrchen $10^{-4}$ wurden 2 ccm (vor Einsaat der Colibakterien) entnommen und zu 200 ccm Bouillon ($p_H = 7{,}07$) zugesetzt. Die Titration dieser (in einem Kolben enthaltenen) Bouillon ergab den rechnungsgemäßen Lysinexponenten 2. Einstellen des Kolbens in ein Wasserbad von 37°; Einsaat einer Öse 16stündiger Colibouillonkultur; Probeentnahmen (zwecks Bakteriophagentitration und Bestimmung der Keimzahlen) nach 0, 30, 60, 90, 105, 120, 150, 180, 195, 210, 270, 330 Minuten. Tabelle und Diagramm sind so zu interpretieren wie im vorangehenden Versuch.

| Zeit der Entnahme: | Lysinexponent: | Keimzahlen im ccm: |
|---|---|---|
| 0 Minuten | 2 | 6 000 |
| 30 „ | 2 | 6 000 |
| 60 „ | 1 | 7 000 |
| 90 „ | 2 | 20 000 |
| 105 „ | 1 | 50 000 |
| 120 „ | 2 | 100 000 |
| 150 „ | 1 | 300 000 |
| 180 „ | 4 | ∞ |
| 195 „ | 5 | ∞ |
| 210 „ | > 7 | ∞ |
| 270 „ | > 7 | 200 |
| 330 „ | 6 | θ |



Leider waren die Titrationen zweimal (bei den Probeentnahmen nach 210 und 270 Minuten) nicht bis zur Grenze fortgeführt worden. Gewisse Erfahrungen erlauben uns aber die Annahme, daß der Titer nicht über den Exponenten 9 hinausgehen konnte, woraus wieder folgt, daß das Maximum nach 210 Minuten bereits erreicht war, also zur gleichen Zeit wie im ersten Versuch. — Die Inkubation des Lysinanstiegs belief sich dieses Mal auf $2^1/_2$ Stunden; auch fanden in dieser ersten Phase kleine Oszillationen des Titers zwischen 1 und 2 statt, die aber höchstwahrscheinlich nur scheinbar sind, indem der wahre Wert zwischen 1 und 2 und zwar näher bei 2 lag, so daß die Ungenauigkeiten beim Titrieren bald den Ausschlag nach der einen, bald nach der anderen Seite hin herbeiführten. Die nach 180, 195 und 210 Minuten angefertigten Gelatineplatten waren zu dicht, um eine genauere Zählung der Colikolonien vorzunehmen, was durch das ∞-Zeichen ausgedrückt wird.

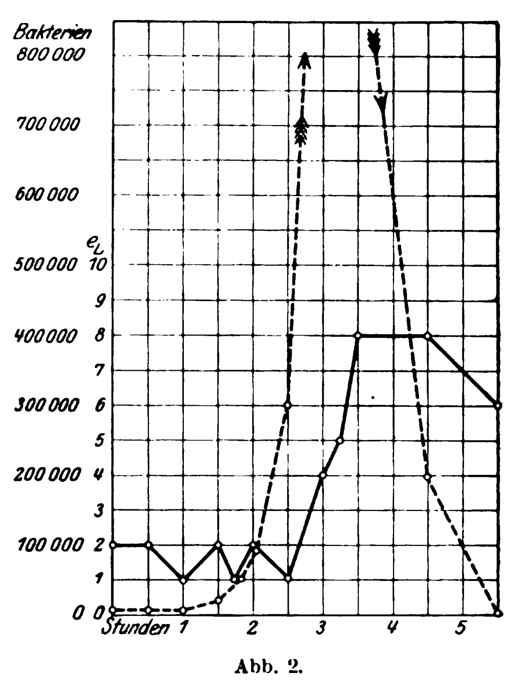



Abb. 2.

Die Zunahme der Bakteriophagenkonzentrationen vollzog sich, wie ein Blick auf die beiden Abbildungen zeigt, nicht so regelmäßig wie im ersten Versuch; immerhin lagen die Werte der Lysinexponenten im aufsteigenden Schenkel doch noch annähernd auf einer geraden Linie.

Die Geschwindigkeit des Lysinanstieges übertraf jene im ersten Versuch dagegen erheblich; der Lysinexponent stieg in einer Stunde von 1 bis auf 8 (oder 9), während im ersten Experiment für die gleiche Vervielfachung $1^3/_4$ Stunden notwendig waren. Es liegt nahe, diesen Unterschied auf die schnellere und intensivere Vermehrung der eingesäten Bakterien zu beziehen.

Es wurde betont, daß sich die in den beschriebenen zwei Experimenten gewählte Versuchsanordnung aus der Frage, welche sie lösen sollte, ergab; die Ausbeute, welche zunächst nur in der Erkenntnis einer zeitlichen Koordination bestimmter Vorgänge an den Bakterien und gewisser quantitativer Veränderungen am Lysin (den Bakteriophagen) bestand, ließ sich jedoch durch Variierung einzelner Faktoren vergrößern.

Vor allem war daran zu denken, *das Lysin nicht gleichzeitig mit oder kurz vor der Einsaat der Bakterien zur Bouillon hinzuzufügen, sondern erst in einem Moment, in welchem die Bakterienvermehrung eingesetzt hatte oder schon einige Zeit im Gange war.* Die Tatsache, daß die



Latenzperiode des Bakterienwachstums und jene der Lysinzunahme annähernd gleich lang sind, und der Umstand, daß überhaupt eine Latenz des Lysinanstieges besteht, lassen ja an sich eine verschiedene Deutung zu. So könnte man sich vorstellen, daß die Bakteriophagen im Sinne der Hypothese von *d'Hérelle* Mikroorganismen sind, in welchem Falle die Inkubation ihrer Vermehrung ein bloßes Analogon zum „bacterial lag" darstellen würde, ohne daß zwischen beiden ein kausaler Konnex bestehen müßte. Das Experiment rechtfertigt aber diese Vermutung keineswegs.

*Versuch.*

Ein Erlenmeyerkolben mit 200 ccm Bouillon wurde mit Lysin (bakterienfreier Bakteriophagenbouillon) versetzt, so daß der Lysinexponent im Kolben 1 betrug. Der Kolben kam dann in ein Wasserbad von 37°, wurde mit einer Öse 16stündiger Colibouillonkultur beimpft (zur Zeit $t = 0$) und nun nach 0, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 und 360 Minuten auf seinen Bakteriophagengehalt und auf die Zahl der lebenden Colibakterien im Kubikzentimeter Bouillon untersucht. Dieser Kolben funktionierte als *Kontrolle* für einen *zweiten Kolben* mit 200 ccm der gleichen Bouillon, der im nämlichen Wasserbad stand, zur Zeit $t = 0$ mit derselben Menge Colibacillen beimpft wurde, zunächst aber noch kein Lysin enthielt. In diesem Kolben erfolgte somit eine einfache Bakterienvermehrung wie in einer Bouillon von identischer Beschaffenheit. *Erst zur Zeit $t = 180'$ (3 Stunden nach der Bakterieneinsaat) setzten wir diesem Kolben Lysin zu, und zwar in der gleichen Menge wie dem Kontrollkolben.* Die sofort ausgeführte Bakteriophagentitration ergab aber nicht den Lysinexponenten 1, sondern 0, ein Umstand, der vermutlich mit der Anwesenheit der Bakterien zusammenhing, der aber für die Deutung des Versuchsresultates jedenfalls völlig belanglos war. Die Ergebnisse der Titrationen findet man in nachstehender Tabelle zusammengestellt, wobei die linke Seite die Verhältnisse bei gleichzeitiger Einsaat von Lysin und Bakterien (Kontrollkolben) illustriert, während sich die rechte Seite auf den eigentlichen Versuchskolben (Lysinzusatz zur Zeit fortschreitender Bakterienvermehrung) bezieht.

| Kontroll-Kolben | | Zeit: | Versuchs-Kolben | |
|---|---|---|---|---|
| Lysinexp.: | Bakterienzahl: | | Lysinexp.: | Bakterienzahl: |
| 1 | 660 | 0 Min. | | |
| 1 | — | 120 ,, | | |
| 1 | 46 000 | 150 ,, | | |
| 2 | 96 000 | 180 ,, | 0 | 100 000 |
| 3 | 270 000 | 210 ,, | 2 | 222 000 |
| 6 | 675 000 | 240 ,, | 5 | 570 000 |
| 7 | 400 | 270 ,, | 6 | 120 000 |
| 8 | 10 | 300 ,, | 8 | 5 000 |
| 8 | θ | 360 ,, | 8 | θ |

Die wichtigste Tatsache, die sich aus den gefundenen Werten ableiten läßt, ist *das komplette Fehlen der Inkubationsperiode des Lysinanstieges.* Wenn man die initiale Lysinquantität erst in der Phase der fortschreitenden Bakterienproliferation einträgt, so schließt sich die Lysinzunahme unmittelbar an diesen Akt an und *zeigt sofort jene Geschwindigkeit, die wir bereits aus dem ersten Versuch kennen*: *Verzehn-*



*fachung innerhalb von je 15 Minuten.* Der maximale Titer (Lysinexponent 8) wird unter den gewählten Bedingungen zur selben Zeit (300 Minuten nach der Bakterieneinsaat) erreicht wie im Kontrollkolben, obwohl in diesem die gegenseitige Beeinflussung von Bakterien und Lysin schon 3 Stunden früher einsetzen konnte. Bakterienwachstum und Lysinzunahme laufen daher nicht einfach infolge irgendwelcher Ursachen nebeneinander her, sondern stehen in einem Abhängigkeitsverhältnis, welches wohl kaum anders aufgefaßt werden kann, als daß die Bakterienvermehrung oder ein von derselben direkt abhängiges Moment die Lysinzunahme auslöst.

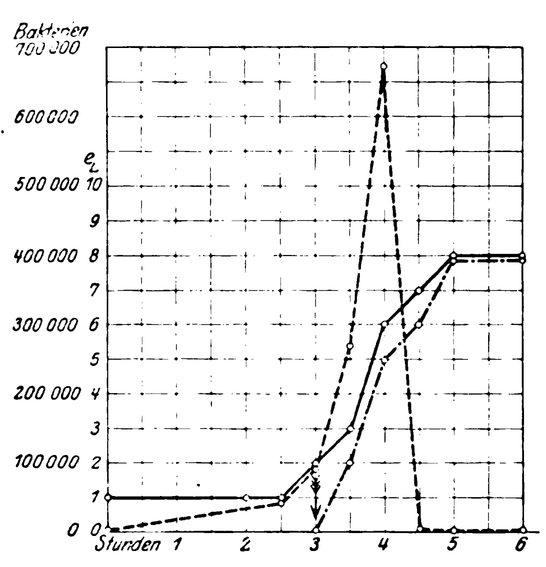



Abb. 3. Die ausgezogene Linie entspricht dem Anstieg des Lysinexponenten im Kontrollkolben, die punktiert-gestrichelte jenem im Versuchskolben. Die Bakterienzahlen waren in beiden Kolben fast gleich, so daß sie, um die Übersichtlichkeit des Diagramms nicht zu stören, nur für den Kontrollkolben eingetragen wurden (gestrichelte Linie). Der Pfeil markiert den Moment des Lysinzusatzes zum Versuchskolben.

Weiter ersieht man, *daß innerhalb der ersten 3 Stunden nach der Bakterieneinsaat die Bakterienvermehrung im gleichen Tempo vor sich geht, gleichgültig, ob die Nährflüssigkeit lysinfrei oder lysinhaltig ist.* 3 Stunden nach der Beimpfung mit gleichen Mengen lebender Colikeime enthält sowohl der lysinhaltige Kontrollkolben als der lysinfreie Versuchskolben etwa 100 000 entwicklungsfähige Colibacillen im Kubikzentimeter. Es hat sonach den Anschein, als ob das Lysin die Bakterien überhaupt nicht direkt zu schädigen vermag. *Korrekterweise muß aber diese Aussage auf die geprüften Lysinkonzentrationen beschränkt werden, die, wie sich aus den mitgeteilten Versuchsprotokollen ergibt, den Lysinexponenten 0—2 (inklusive) korrespondieren.* Es wäre sehr gut möglich, daß höhere Lysinkonzentrationen, wenn sie schon im Beginne des Vorganges vorhanden sind, ein wesentlich anderes Verhalten zeigen und daß unter diesen Umständen das Bakteriensterben ohne Verzug anhebt; den Abbildungen 1 und 3 kann man entnehmen, daß die Verminderung der Keimzahlen eintritt und rasch bis zur Sterilisation des Reaktionsvolums abläuft, sobald sich der Lysinexponent in einem oberhalb des Wertes 5 gelegenen Niveau bewegt, und es besteht natürlich kein Hindernis, diese Erscheinung dahin auszulegen, daß eben für die Bakteriolyse ein Schwellenwert der Lysinkonzentration erforderlich ist. Aber auch wenn sich die Dinge so verhielten, würde nichts an einer



prinzipiellen Feststellung geändert werden: *Das Lysin nimmt zu, bevor es noch zu einem nachweisbaren und von der Norm*, d. h. von den Verhältnissen in lysinfreier Bouillon *abweichenden, diese Norm überragenden Bakterienzerfall gekommen ist.* Denn nach 180 Minuten war der Bakteriengehalt im lysinhaltigen Kolben noch ebenso groß wie im lysinfreien, aber der Lysinexponent war bereits auf 2 angewachsen. Um gerade über diesen Punkt erhöhte Gewißheit zu erlangen, und um deutlichere Ausschläge zu erzielen, wiederholten wir das Experiment, schalteten aber zwischen die Colieinsaat und den Lysinzusatz ein längeres Intervall (5 Stunden) ein und führten mit dem Inhalte des Versuchskolbens häufigere Keimzählungen aus, speziell auch vor der Zufügung des Lysins. Im übrigen war die Anordnung die gleiche, so daß wir von Wiederholungen absehen dürfen und nur Tabelle und Diagramm reproduzieren.

*Versuch.*

| Kontroll-Kolben | | Zeit: | Versuchs-Kolben | |
|---|---|---|---|---|
| Lysinexp: | Bakterienzahl: | | Lysinexp. | Bakterienzahl |
| 1 | 1 800 | 0 Min. | | 1 600 |
| 1 | 4 500 | 60 „ | | 6 800 |
| 1 | 38 000 | 120 „ | | 40 000 |
| 4 | 375 000 | 180 „ | | 380 000 |
| 6 | 1 300 000 | 240 „ | | 3 370 000 |
| 7 | θ | 270 „ | | 9 500 000 |
| 8 | θ | 800 „ | 1 | 25 000 000 |
| 8 | θ | 330 „ | 4 | 40 000 000 |
| 8 | θ | 360 „ | 6 | 75 000 000 |
| | | 390 „ | 7 | 70 000 000 |
| | | 420 „ | 7 | 70 000 000 |
| | | 480 „ | 7 | 80 000 000 |

Abb. 4. Linien und Pfeil besitzen dieselbe Bedeutung wie in Abb. 3. Die Kurve für die Bakterienvermehrung im Versuchskolben fällt mindestens bis zur Zeit $t = 3$ Stunden mit der Kurve für den Kontrollkolben zusammen.

Auch diesmal schloß sich also der Lysinanstieg im Versuchskolben unmittelbar dem Lysinzusatz an und zeigte sofort die gewohnte Geschwindigkeit; in $1^1/_2$ Stunden war der Lysinexponent von 1 auf 7 angewachsen.

Was uns aber besonders interessiert, ist die Beob-

achtung, *daß der Lysinexponent im Kontrollkolben nach 180 Minuten bereits den Wert 4 angenommen hatte, daß aber die Keimzahl noch ganz die gleiche war wie im lysinfreien Versuchskolben.* Der Anstoß zur Lysinvermehrung kann also nicht in einem abnorm starken Bakterienzerfall gesucht werden. Erst vom Lysinexponenten 6 angefangen bleiben die Keimzahlen im lysinhaltigen Kolben gegen das lysinfreie Pendant evident zurück.

Auffallend erscheint schließlich das Verhalten der Bakterien im Versuchskolben insofern, als keine Sterilisation mehr eintritt, sondern nur ein Stillstand der Keimzahl auf einem sehr hohen Niveau (70 bis 80 Millionen im Kubikzentimeter); auffallend insofern, als sich ja das zugesetzte Lysin vermehrt und jene Konzentrationen erreicht, bei denen sonst, d. h. bei geringerer Keimzahl (einige Hunderttausend bis zu etwa einer Million im Kubikzentimeter), die Lyse einzusetzen und bis zur völligen Vernichtung aller Bakterien anzudauern pflegt. Der Grund für diese Abweichung von dem bisher festgestellten Verlauf kann nur darin liegen, *daß die Konzentration der Bakterien zur Zeit des Lysinzusatzes schon zu hoch war.* Daß ein beträchtlicher Bakterienüberschuß die Bakteriolyse im flüssigen Milieu (in Bouillon) hemmt, wurde übrigens schon von mehreren Autoren, so von *d'Hérelle*, *Bail*, *Davison* u. a. berichtet; die maximalen, der Lyse noch zugänglichen Bakterienzahlen wurden verschieden, meist auf 100—500 Millionen Keime im Kubikzentimeter taxiert, was im Vergleich zu unseren Ergebnissen zu hoch gegriffen scheint. Aber die Angaben stützen sich auf Versuche, die unter wesentlich anderen, zum Teil auch unter gar nicht genau präzisierten, daher nicht reproduzierbaren Bedingungen stattfanden, so daß Vergleiche nicht oder nicht leicht angestellt werden können. Daß die Zahl der Tâches stériles auf Agarplatten nicht nur von der Konzentration des aufgetragenen Lysins, sondern auch von der Menge der ausgesäten Bakterien abhängt und bei einem Überschuß der letzteren ceteris paribus abnehmen kann (*Gratia*), harmoniert mit den Beobachtungen an flüssigen Nährmedien gut und stellt sich als Wirkung einer und derselben Ursache unter einer anderen Form dar.

*Gratia* nimmt an, daß der Hemmung der Bakteriolyse infolge von Bakterienüberschuß eine Inaktivierung des lytischen Prinzips durch Adsorption an die Bakterienzellen zugrunde liegt. Eine Adsorption ist nun denkbar, ja sehr wahrscheinlich; aber sie kann nicht mit einer Inaktivierung verknüpft sein, da das lytische Prinzip auch bei vorhandenem Bakterienüberschuß stundenlang nachweisbar bleibt, sich vermehrt und schließlich sogar einen hohen Titer aufweist (vgl. Abb. 4). Würde eine Adsorption des Lysins an Bakterienzellen stattfinden und zu einem Unwirksamwerden dieses Stoffes führen, dann wäre der Effekt wohl auch zu beobachten, wenn man tote Bakterienleiber in größeren Mengen dem Reaktionsvolum zufügt; die Fähigkeit der



Adsorption kann nicht als ausschließliches Attribut der lebenden Zellen gedacht werden. Abgetötete Bakterien hindern jedoch die Lyse der lebenden Bakterien nicht, ebensowenig wie die Vermehrung des vorhandenen Lysins.

*Versuch.*

Eine 24stündige Schrägagarkultur des Stammes „Coli sensibel" wird mit 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt, die Suspension durch 1stündiges Erwärmen auf 57° C abgetötet (Sterilitätsprobe) und in folgender Weise verwendet:

Röhrchen I enthält: 9 ccm Bouillon + 0,3 ccm der abg. Colisuspension.

Röhrchen II enthält: 9 ccm Bouillon + 0,3 ccm Colisuspension + 1 Öse 16stündiger Coli-Bouillonkultur.

Röhrchen III enthält: 9 ccm Bouillon + 0,3 ccm Colisuspension + 1 Öse Coli-Bouillonkultur + 1 Öse konzentrierte keimfreie Bakteriophagenbouillon.

Röhrchen IV enthält: 9 ccm Bouillon + 1 Öse Coli-Bouillonkultur + 1 Öse konzentrierte Bakteriophagenbouillon (Lysin).

Röhrchen V enthält: 9 ccm Bouillon 0,3 Colisuspension + 1 Öse Lysin.

Röhrchen VI enthält: 9 ccm Bouillon + 1 Öse Coli-Bouillonkultur.

Nach 8stündiger Bebrütung zeigen die Röhrchen II und VI reichliche Trübung und Gasbildung infolge des Wachstums der eingebrachten Colibakterien; IV ist vollständig klar geblieben (Kontrolle für die Wirksamkeit des Lysins und die Empfindlichkeit der eingesäten Bakterien); I, III und V zeigen eine identische mäßige Trübung, die bereits vor der Bebrütung in gleichem Grade bestand und auf die zugesetzten abgetöteten Colibacillen zurückzuführen war. Titrationen des Bakteriophagen- (Lysin-) Gehalts in den Röhrchen III, IV und V ergaben, daß der Titer des Röhrchens V infolge der Bebrütung nicht zugenommen hatte, während die Röhrchen III und IV einen starken Anstieg des Lysins erkennen ließen, so daß der Lysinexponent des Inhaltes dieser beiden Eprouvetten den gewöhnlichen Maximalwert 8 angenommen hatte. Wiederholungen des Versuchs lieferten das nämliche Resultat, an dem sich auch nichts änderte, wenn man statt der abgetöteten Colibacillen abgetötete Staphylokokken verwendete.

Trotzdem somit dem Reaktionsvolum abgetötete Bakterienzellen (des empfindlichen Stammes!) in dem Ausmaße zugesetzt wurden, daß die Bouillon ($p_H = 7-7{,}4$) deutlich getrübt schien, trat das Bakteriophagenphänomen ein; denn die Trübung nahm nicht weiter zu (wie das in dem lysinfreien Röhrchen II der Fall war) und der Lysinexponent stieg auf 8, d. h. ein hundertmillionstel Kubikzentimeter genügte, um in einem neuen, mit Bakterien beimpften Bouillonröhrchen den bakteriophagen Vorgang einzuleiten.

Der Versuch erlaubt jedoch noch einige Ableitungen. Daß abgetötete Bakterien nicht angegriffen werden, ist nur eine weitere Bestätigung eines Punktes, über den alle Autoren einig sind. Dementsprechend erfuhr die Trübung im Röhrchen V trotz Lysinzusatz und Bebrütung keine Aufhellung und der Lysintiter nahm auch nicht zu. Wir wissen indes, daß sich u. U. auch lebende Bakterien in niedrigen Lysinkonzentrationen nicht verändern, und könnten demzufolge geneigt sein, die Unlösbarkeit der toten Leiber auf die unterschwellige Lysinkonzentration zu beziehen, welche sich im Kontakt mit abgestorbenen Bak-





terienzellen auch nicht spontan erhöht. Aber dieser Einwand wird hinfällig durch das Verhalten der Probe III; in dieser sorgten lebende und proliferierende Bakterien für die Steigerung der Lysinkonzentration auf ein Maximum und trotzdem wurden die toten Leiber in die Lyse nicht einbezogen, sie verharrten in der Bouillon wie inerte Fremdkörper, denn die von ihnen *verursachte Trübung* blieb stationär.

Am Schluß dieser Mitteilung mögen noch einige interessantere Experimente über den *Einfluß der Temperatur* auf die geschilderten Vorgänge Platz finden. 37° C stellen für die Bakteriophagenwirkung ein Optimum dar, und es muß daher die Frage aufgeworfen werden, wie sich Bakterienvermehrung und Lysinzunahme verhalten, wenn man von diesem Optimum nach oben oder unten abweicht.

Als Abweichung nach unten wählten wir zunächst eine Wasserbadtemperatur von 30° C.

*Versuch.*

Zu einem Kolben, welcher 200 ccm Bouillon vom $p_H = 7{,}28$ enthielt, wurde so viel konzentriertes Lysin zugesetzt, daß der Lysinexponent des Kolbeninhaltes 1 betrug. Der Kolben kam darauf ins Wasserbad von 30° C und wurde nach vollzogenem Temperaturausgleich mit 1 Öse 16stündiger Coli-Bouillonkultur beimpft. Nach 60, 120, 180, 210, 240, 300 und 420 Minuten Probeentnahmen zwecks Feststellung des Bakteriophagentiters und der Keimzahlen.

| Abgelaufene Zeit: | Lysinexp.: | Keimzahlen: |
|---|---|---|
| 0 Minuten | 1 | 12 000 |
| 60 „ | 1 | 12 000 |
| 120 „ | 1 | 18 000 |
| 180 „ | 3 | 24 000 |
| 210 „ | 2 | 81 000 |
| 240 „ | 4 | 135 000 |
| 300 „ | 9 | 540 000 |
| 420 „ | ? (Fehler bei der Auswertung) | 2 500 |

Die Resultate waren den bei 37° C erzielten im allgemeinen ziemlich ähnlich, nur trat die Lyse etwas später ein. Eine Diskussion der Ziffern oder eine graphische Darstellung der Tabelle kann daher unterbleiben. Offenbar war die Differenz zwischen 37 und 30° C zu gering, um erheblichere Ausschläge zu verursachen, eine Vermutung, die insofern gerechtfertigt wurde, als Vorversuche bei Zimmertemperatur de facto lehrten, daß Temperaturerniedrigung, wenn sie nur genügend ausgiebig ist, denn doch tiefgreifendere Modifikationen der Vorgänge, wie sie für 37° C typisch sind, herbeizuführen vermag. Doch sparen wir uns die Wiedergabe solcher Auswertungsreihen für später auf und wollen uns vorerst mit der wichtigeren Wirkung der Temperaturerhöhung befassen.

Daß Hitzegrade, welche jede Vermehrung der Bakterien verhindern und bei hinreichend langer Einwirkungsdauer die Bakterien abtöten (z. B. 50° C oder darüber), auch keine Lysinzunahme gestatten wür-



den, war a priori anzunehmen. Was aber erfolgt, wenn die Temperatur zwar relativ hoch, aber doch immerhin so eingestellt ist, daß sich die Bakterien noch stark vermehren können? Colibacillen gedeihen bekanntlich noch über 40° ganz gut; wir beschlossen daher, das Wasserbad probeweise auf 43° C zu erwärmen.

*Versuch.*

Von der Temperatur des Wasserbades abgesehen, war die Versuchsanordnung ganz die gleiche wie in den Experimenten bei 37° C. Der Leser sei daher auf diese Protokolle verwiesen; die Resultate sind der Tabelle ohne weiteres zu entnehmen.

| Abgelaufene Zeit: | | Lysinexp.: | Bakterienzahlen: |
|---|---|---|---|
| 0 | Minuten | 1 | 14 000 |
| 30 | „ | 1 | 14 000 |
| 90 | „ | 1 | 24 000 |
| 120 | „ | 1 | 44 000 |
| 180 | „ | 1 | 54 000 |
| 240 | „ | 1 | 120 000 |
| 300 | „ | 1 | 200 000 |
| 360 | „ | 1 | ∞ |
| 420 | „ | Lysin nicht nachweisbar | ∞ |
| 480 | „ | „ | ∞ |
| 540 | „ | „ | ∞ |
| 660 | „ | „ | ∞ |

Es war also nicht nur keine Lysinzunahme erfolgt (trotz stärkster Bakterienvermehrung!), sondern das Lysin, welches dem Kolben zugesetzt worden war, verschwand zwischen der 6. und 7. Stunde völlig. Besondere Kontrollen lehrten, daß die Temperatur von 43° C an sich das Lysin selbst bei 10stündiger Einwirkung nicht abschwächt, gleichgültig, ob man eine konzentrierte Lysinlösung oder eine Bouillon vom Lysinexponenten 1 so lange dem erwähnten Wärmegrad aussetzt. Um einen der Aufmerksamkeit entgangenen Versuchsfehler konnte es sich auch nicht handeln, denn bei den Wiederholungen waren die Resultate im Prinzip die gleichen; so wurden z. B. in einem anderen Falle folgende Ziffern gewonnen:

| Abgelaufene Zeit: | | Lysinxep.: | Bakterienzahl: |
|---|---|---|---|
| 0 | Minuten | 1 | 15 000 |
| 30 | „ | 2 | 7 000 |
| 60 | „ | 2 | 8 000 |
| 90 | „ | 2 | 8 000 |
| 105 | „ | 1 | 12 000 |
| 120 | „ | 2 | 15 000 |
| 150 | „ | 2 | 61 000 |
| 180 | „ | 2 | 85 000 |
| 195 | „ | 1 | 135 000 |
| 210 | „ | 1 | 250 000 |
| 270 | „ | 1 | 1 750 000 |
| 330 | „ | 1 | 5 000 000 |
| 390 | „ | Lysin nicht nachweisbar | ∞ |
| 450 | „ | „ | ∞ |
| 510 | „ | „ | ∞ |
| 600 | „ | „ | ∞ |



Die Vermehrung der Bakterien bis zu dem bei 37° C wirksamen Grade genügt, wie man nun erkennt, keineswegs, um eine Lysinzunahme auszulösen; die Temperatur von 43° C verhindert den Lysinanstieg unter den präzisierten Versuchsbedingungen glatt und ausnahmslos. Da die Lysinkonzentration andauernd auf dem niedrigen Niveau verharrt, auf dem auch bei 37° C keine Auflösung der Bacillen stattfindet, so könnte das Ausbleiben der Lyse bei 43° C unter Umständen als direkte Konsequenz des fehlenden Lysinanstieges aufgefaßt werden. Allerdings bedarf diese Ansicht einer experimentellen Fundierung, auf die wir später eingehen werden.

Am merkwürdigsten ist wohl der Lysinschwund zwischen der 5. und 7. Stunde. Man kann ja auch da wieder die Adsorption an die so stark vermehrten Mikroben heranziehen. Aber diese „Adsorption" müßte nun wirklich mit einer völligen Zerstörung des Lysins einhergehen; denn das Lysin ist nicht mehr nachweisbar und *die auf den Gelatineplatten wachsenden und abgeimpften Colibacillen zeigten bei wiederholten Prüfungen keine Spur von lysinogenem Vermögen.*

An diesem Punkte müssen wir abbrechen und als zweite Mitteilung eine Arbeit folgen lassen, die für das Verständnis der weiteren Untersuchungen unentbehrlich ist und welche *H. Meuli* im Institut als Dissertation fertiggestellt hat. Diese Publikation wird auch die Literaturnachweise bringen. Aus dem experimentellen Tatsachenmaterial ergeben sich vorderhand nachstehende

*Schlußfolgerungen.*

1. Bei 37° C koexistieren in Bouillon von geeigneter Reaktion ($p_H = 7-7,8$) bestimmte Mengen von lebenden Bakterien (Zehn- bis Hunderttausende im Kubikzentimeter) und niedrige Konzentrationen der korrespondierenden Lysine ($e_L = 1-3$), ohne sich gegenseitig zu beeinflussen. Der Lysintiter des Nährmediums bleibt während solcher Phasen konstant und die innerhalb der Phasen ermittelten Keimzahlen weichen nicht von jenen ab, die sich unter identischen Bedingungen in einem lysinfreien Medium ergeben. Derartige Perioden der „*Lysinlatenz*" schließen sich unmittelbar an die Einsaat von lebenden, empfindlichen Bakterien in eine lysinhaltige Nährbouillon an und entsprechen hinsichtlich ihrer Dauer ungefähr der bekannten Dauer der Inkubation des Bakterienwachstums in frisch beimpften Nährflüssigkeiten (bacterial lag).

2. An diese erste Phase reiht sich jene des *Lysinanstieges*, welche zeitlich mit einer rapiden Zunahme der Bakterienzahlen koinzidiert. Die Geschwindigkeit der Lysinzunahme entspricht im großen ganzen einer Verzehnfachung innerhalb von je 15 Minuten; Abweichungen



von diesem Durchschnitt kommen ebenso vor wie Beibehaltung einer konstanten Vermehrungsintensität bis zur Erreichung des Maximums.

3. Setzt man das Lysin dem Nährboden erst zu einer Zeit zu, wo die Bakterienvermehrung schon in vollem Gange ist, *so fällt die Phase der Lysinlatenz weg und der Lysinanstieg beginnt sofort mit voller Geschwindigkeit.* Die Bakterienvermehrung (oder ein von derselben direkt abhängiger Umstand) ist sonach als das den Lysinanstieg auslösende Moment zu betrachten.

4. Die Bakteriolyse setzt ein, sobald die Lysinkonzentration im Nährmedium einen gewissen Wert ($e_L = 5$) erreicht oder überschreitet. Doch gilt diese Aussage nur, wenn zu dieser Zeit nicht zuviel Bakterien in der Volumeinheit Nährbouillon vorhanden sind; läßt man die Bakterien daher zu stark zunehmen und sät erst dann das Lysin ein, so steigt zwar der Titer des letzteren, aber die völlige Vernichtung und Auflösung der Bakterien bleibt aus. Die Bakteriolyse ist somit keinesfalls nur von einer bestimmten Lysinkonzentration abhängig, sondern auch von der Konzentration der lebenden, empfindlichen Mikroben; ein Überschuß der letzteren hemmt die Lyse, hindert aber nicht die Lysinzunahme.

5. Starker, ja stärkster, innerhalb kurzer Zeit zur kompletten Sterilisation des Nährbodens führender Bakterienzerfall ist oft von einem Konstantbleiben oder gar einem Absinken des Bakteriophagentiters begleitet.

6. Niedrige Temperaturen verlängern die Lysinlatenz erheblich, ebenso wie sie die Bakterienvermehrung verzögern.

7. Bei 43° C vermehrte sich der für diese Untersuchungen verwendete Colistamm rasch und erheblich. Das zugesetzte Lysin nahm jedoch nicht zu, sondern bewahrte den initialen Titer bis zur 5. bis 7. Stunde, um dann völlig zu verschwinden. *Die aus einer solchen Bouillon nach eingetretenem Lysinschwund gezüchteten Colistämme waren nicht lysinogen.*

8. Tote Bakterien werden vom Lysin nicht angegriffen, und zwar auch dann nicht, wenn man durch gleichzeitige Einsaat lebender Keime der gleichen oder einer anderen Art eine Bakteriophagenreaktion in Gang bringt. Die Leiber der toten Bakterien stören den Ablauf solcher Reaktionen anscheinend nicht; zum mindesten gestatten sie die Erreichung eines hohen (maximalen) Lysintiters.

9. Die Dilutionsmethode (*Appelmans*) ist für Bakteriophagentitrationen der Agarplattenmethode (*d'Hérelle*) vorzuziehen. Sie liefert jedoch exakte Resultate nur bei Vermeidung des „Pipettenfehlers“.



(Aus dem Institut „Robert Koch“ [Abt.-Leiter: Dr. *O. Schiemann*].)

# Untersuchungen über Pneumokokkenimmunität.

## II. Mitteilung.

## Veränderungen der Agglutination bei Pneumokokken des Typus I, II und III und bei Streptokokken.

Von
Prof. Dr. **Yoshioka** (Tokio).

In der ersten Mitteilung (Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **96**, 520) wurde nachgewiesen, daß trotz der anscheinend so strengen Spezifität, die den einzelnen Pneumokokkentypen in immunisatorischer Hinsicht nach äußerst zahlreichen, in verschiedenen Ländern übereinstimmend gemachten Beobachtungen allgemein zugeschrieben wird, dennoch zum mindesten zwischen den Haupttypen I und II eine teilweise Gemeinschaft von „Receptoren“ nach *Ehrlichs* Ausdrucksweise besteht, und zwar sowohl von solchen Receptoren, die die Bildung der spezifischen Schutzstoffe, als auch von solchen, die die Entstehung von Agglutininen auslösen. Ersteres wurde bisher nur für die aktive Immunität erwiesen: Mäuse und Meerschweinchen, die mit Pneumokokkus I immunisiert worden waren, erwiesen sich zugleich, wenn auch in schwächerem Grade, immun gegen Pneumokokkus II. Die Sera von Kaninchen, die ich mit Pneumokokkus I vorbehandelt hatte, und zwar im Anschluß an die Mitteilung von *Cole* und *Moore*[1]) mit kleinen Mengen abgetöteter Kokken, waren im Schutzversuch streng spezifisch: sie schützten Mäuse nur gegen Pneumokokken des Typus I, während sie auch in großen Dosen gegen kleine Infektionsdosen geprüft, gegen Typus II ganz unwirksam waren. Dieselben Sera agglutinierten jedoch Pneumokokken vom Typus II und III in verschieden hohen Graden, z. T. ebenso hoch oder sogar höher als den eigenen Typus; sie verloren aber diese Wirkung auf heterologe Stämme völlig, wenn sie etwa 14 Tage lang aufbewahrt wurden, nicht dagegen beim Inaktivieren. Sobald frische Proben von *Pferdesera* zur Verfügung stehen, soll festgestellt werden, ob sie dasselbe Verhalten wie Kaninchensera zeigen.

Das Übergreifen der Agglutination auf fremde Typen ist wohl bisher deshalb der Beobachtung entgangen, weil man in der Regel mit abgelagerten Serumproben arbeitete. Daher galt bisher die Agglutination bei den Pneumokokken als durchaus spezifisch für die einzelnen Typen,

[1]) Journ. of exp. med. **26**, 537.



und dieser strengen Spezifität schien eine absolute Konstanz der typischen Pneumokokken in agglutinatorischer Hinsicht zu entsprechen. Bezüglich der beiden Originalstämme I und *Franz* (= Typus II der amerikanischen Autoren) von *Neufeld* und *Händel* hat *Landau*[1]) ausdrücklich mitgeteilt, daß sie noch nach 8 Jahre langer Konservierung im Exsiccator mit eingeschobenen Mäusepassagen sich unverändert typisch verhielten. Auf einige von anderen Autoren beschriebene Unregelmäßigkeiten bezüglich der Pneumokokkenagglutination kommen wir unten zurück.

Im folgenden soll nun gezeigt werden, daß es auf einfache Weise gelingt, Pneumokokkenstämme des Typus I, II und III so zu verändern, daß sie teils die Agglutinationsfähigkeit für homologe Sera verlieren, teils eine neue Agglutinabilität für heterologe Sera gewinnen.

## I. Atypische Agglutination bei avirulenten oder abgeschwächten Pneumokokken I-Stämmen.

Daß unter gewissen Umständen bei Pneumokokken ein Verlust der Agglutinabilität eintritt, hat *Neufeld*[2]) bereits 1902 in seiner ersten Arbeit „Über die Agglutination der Pneumokokken und die Theorien der Agglutination" mitgeteilt. Er fand, daß ein mit einem Pneumokokkenstamm hergestelltes Kaninchenserum mehrere fremde, virulente Stämme ebenso gut agglutinierte, wie den eigenen; gar nicht beeinflußt wurde dagegen ein fremder Stamm, der von Anfang an avirulent war, und mehrfach wurde beobachtet, daß gut agglutinierende Stämme diese Eigenschaft völlig verloren, sobald sie im Verlauf längerer Fortzüchtung auf Agar ganz avirulent geworden waren. „Für jede Bakterienart muß also erst aufs neue der Kreis bestimmt werden, innerhalb dessen sich die Agglutinationswirkung des mit einem Bacterium hergestellten Serums äußert."

Ich habe nun zunächst einen Pneumokokkus Am. I (Originalstamm vom Rockefellerinstitut übersandt) durch längere Züchtung auf Agar und häufiges Stehenlassen im Tageslicht in einigen Wochen so weit abgeschwächt, daß 0,1 Bouillonkultur i. per. eine Maus nicht mehr tötete. Nur die enorme Dosis 0,5 ccm i. per. führte innerhalb von 3 Tagen zum Tode. Den Stamm bezeichne ich als Pneum. Am. I Var. A. Morphologisch war die Kultur unverändert, sie wuchs auch nicht, wie avirulente Pneumokokken sonst häufig tun, bei Zimmertemperatur und wurde durch Natr. tauroch. in der Konzentration 1:100 (0,1 einer 10proz. Lösung zu 0,9 Bouillonkultur) langsamer als virulente Stämme, aber doch in 30 Minuten schließlich gelöst.

[1]) Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **79**, 424.

[2]) Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. **40**, 61.



Diesen Stamm prüfte ich mit einem vom Rockefellerinstitut erhaltenen Typus I-Pferdeserum, sowie mit dem Serum eines Kaninchens, das ich selbst mit dem amerikanischen Stamm I (abgetötete Kultur) vorbehandelt hatte; von beiden Sera wurden mehrere homologe Stämme im Brutschrank innerhalb 24 Stunden bis 1 : 200 stark agglutiniert. Bezüglich der Technik der Agglutination verweise ich auf meine erste Mitteilung. Den avirulenten Stamm (Am. I Var. A.) agglutinierten dagegen beide Sera nur bis 1 : 25. Etwa ebenso hoch wurde er aber durch das Serum eines Kaninchens, das gegen Typus II immunisiert war, beeinflußt und noch erheblich stärker (1 : 100 +) durch ein Pneum. II-Pferdeserum des Rockefellerinstituts (vgl. Tab. I).

Mit diesem avirulenten Stamm (abgetötete Kultur) behandelte ich nun ein Kaninchen. Das erhaltene Serum (Serum Pneum. I avir. Var. A.) beeinflußte den virulenten Stamm I gar nicht; mit dem avirulenten konnte es nicht geprüft werden, da der soeben beschriebene Stamm verloren ging.

Ich züchtete nunmehr den Originalstamm Pneum. Am. I zwecks Abschwächung 14 Tage lang bei 39°, wobei ich die Kulturen jeden zweiten Tag überimpfte. Der so durch 7 malige Umzüchtung gewonnene Stamm (Am. I Var. C.) erwies sich als *völlig* avirulent, selbst 0,5 ccm tötete i. per. Mäuse nicht. Auch dieser Stamm wuchs nicht bei Zimmertemperatur. Durch Natr. taur. wurde er in der Konzentration 1 : 100 nur teilweise aufgelöst.

Agglutinatorisch verhielt der Stamm sich insofern ebenso wie der vorige, als er durch das mit dem virulenten Stamm I gewonnene Kaninchenserum nur ganz schwach bis 1 : 25 agglutiniert wurde, ebenso hoch aber auch durch die mit virulenten Stämmen gewonnenen Kaninchensera Am. II und III.

Als ich diesen Stamm mit den vom Rockefellerinstitut erhaltenen agglutinierenden Pferdesera untersuchte, fand ich ein ganz anderes Verhalten, wie gegenüber den Kaninchensera: der Stamm wurde nämlich nicht nur von dem Pneum. I-, sondern ebenso von dem Pneum. II-Serum bis zur halben Titerhöhe (1 : 100), und von dem III-Pferdeserum wenigstens bis 1 : 50 agglutiniert, während das II- und III-Serum natürlich den *virulenten* Stamm Am. I gar nicht beeinflußten.

Am stärksten, nämlich mindestens bis 1 : 400 (die Grenze wurde nicht festgestellt) wurde der Stamm aber durch das oben erwähnte mit dem ersten avirulenten Stamme hergestellte Kaninchenserum agglutiniert.

Normalpferdeserum und *Aronson*sches Streptokokkenpferdeserum war auf denselben Stamm ohne Wirkung (vgl. Tab. I).

Von besonderem Interesse erscheint es, daß nicht nur völlig oder fast völlig avirulente Pneumokokken, die sich ja vielfach auch in anderen Beziehungen von den virulenten unterscheiden, in ihrem serologischen



Verhalten verändert sind, sondern daß sich auch bei Stämmen, die immerhin noch eine mittlere oder sogar eine ziemlich hohe Virulenz besitzen, auffallende Unregelmäßigkeiten in der Agglutination finden. Allerdings bezieht sich das auf Stämme, die vorher hochvirulent waren, und die dann bei der Fortzüchtung im Laboratorium teils absichtlich, teils (s. u.) unabsichtlich verändert waren. Über das agglutinatorische Verhalten solcher Stämme, die von Anfang an von mittlerer Virulenz sind (wie sie z. B. bei Ulcus serpens oft gefunden wurden), haben wir bisher keine Erfahrungen.

Als der zuletzt beschriebene Stamm erst einige Tage lang bei 39° gezüchtet worden war, war er nur unvollkommen abgeschwächt (= Pneu. Am. I Var. B). Seine Virulenz war folgende: Maus 0,01 i. per. † in 2 Tagen, Maus 0,001 i. p. lebt.

Schon damals verhielt er sich jedoch den spezifischen Kaninchen- und Pferdesera des Typus I und II gegenüber ebenso wie später, als er völlig avirulent geworden war; durch das Pferdeserum vom Typus III wurde er aber bis zur Titergrenze (1:200) beeinflußt.

Ferner agglutinierte er aber, wenn auch nur schwach (1:10) mit dem Serum eines Kaninchens, das ich mit abgetöteter Kultur des Streptokokkus Aronson immunisiert hatte, sowie mit dem Serum eines anderen Kaninchens, das ich mit einer Modifikation des Streptokokkus Aronson, nämlich einem daraus abgespaltenen avirulenten Viridans vorbehandelt hatte (vgl. unten). Dieses Kaninchenserum agglutinierte den in Rede stehenden schwach virulenten Pneumokokkus I-Stamm bis 1:25, während der Viridansstamm selbst bis 1:800 agglutiniert wurde. Der Stamm zeigte also sowohl diesen Streptokokkensera als auch dem Pneum. III-Serum gegenüber stärkere Mitagglutination, als später, nachdem er noch länger bei 39° gezüchtet und gänzlich avirulent geworden war.

Weiterhin untersuchte ich einen dem Typus I zugehörigen Pneumokokkus Wachholz, der wiederum durch Züchtung bis 39° in geringerem Grade abgeschwächt war: i. p. eingespritzt tötete 0,0001 eine Maus in 2 Tagen; 0,00001 nicht mehr (Pneum. Wa. Var. A abgeschwächt).

Auch dieser Stamm zeigte sich serologisch verändert, wenn auch in geringerem Grade. Er wurde noch ebenso wie ursprünglich sowohl durch Kan. I- wie Pferd I-Serum agglutiniert, zeigte aber bereits in gewissem Grade eine Beeinflussung durch fremde Sera. Er agglutinierte allerdings nicht mit dem oben erwähnten mit einem avirulenten Pneum. I hergestellten Kaninchenserum und ebensowenig mit Pneum. II-Sera, dagegen schwach mit Pneum. III-Kaninchen- und Pneum. III-Pferdeserum (1:25 bzw. 1:10±), sowie ferner mit den beiden Kaninchensera, die durch Vorbehandlung mit dem Streptokokkus Aronson bzw. mit dem daraus abgespaltenen Streptococcus viridans erzeugt waren.



Derselbe Stamm Wa. wurde nun durch weitere Züchtung bei 39° in zwei verschiedenen Varianten erhalten, die beide stark abgeschwächt waren (Wachholz Var. B und C). Nunmehr war die Virulenz so gering, daß 0,1 bzw. 0,3 i. p. nicht mehr tötete. Diese stark abgeschwächten Stämme zeigten aber nun (ähnlich wie im vorigen Fall beim Pneumokokkus Aronson Var. B und C) keine Agglutination mehr mit den Streptokokkenseris; dagegen agglutinierten sie, wenn auch nur schwach, mit den gegen II und III gerichteten Kaninchen- und Pferdesera: Durch das mehrfach erwähnte mit dem ersten avirulenten Pneum. I gewonnene Serum wurde die Variante B bis 1 : 25, C dagegen bis 1 : 400 agglutiniert. Gegenüber dem Pneum. I Kaninchen- und Pferdeserum hatten sie die volle Agglutinabilität behalten (vgl. Tab. I).

Obwohl die in den zuletzt beschriebenen Fällen erzielten Veränderungen größtenteils nicht so stark waren wie in den ersten Fällen, zeigen sie doch mehrere neue Tatsachen.

Wichtig ist vor allem, daß atypische Agglutinationserscheinungen bereits bei Stämmen eintreten können, die bei gewöhnlicher Prüfung, etwas bis 0,0001 ccm herab, als durchaus virulent erscheinen.

Interessant ist aber ferner, daß diese relativ wenig veränderten Stämme in *einer* Hinsicht eine weitergehende grundsätzlich wichtige Umwandlung erlitten haben; sie zeigen nämlich eine deutliche Receptorengemeinschaft mit einem *Streptokokkus*, und zwar mit dem Stamm Aronson, der gerade immunisatorisch so genau studiert ist und an dessen Charakter als echter Streptokokkus nicht der mindeste Zweifel sein kann.

Durch diese Versuche, wonach bereits Pneumokokkenstämme, die nur in geringem Maße abgeschwächt sind, in verschiedener Weise unregelmäßig agglutinieren können, klärte sich nachträglich eine merkwürdige Beobachtung auf, die *Schiemann* an einem Stamm des Typus I, der dem Institut durch Herrn Prof. *Madsen* aus Kopenhagen zugesandt wurde, gemacht hatte. Der Stamm war als Agarstichkultur angelangt und wurde auf eine Maus verimpft. Herz und Milz der an Pneumokokkensepsis eingegangenen Maus wurden zunächst als Exsiccatormaterial aufbewahrt ohne Prüfung des Typus, da uns damals Serum noch nicht zur Verfügung stand. Durch Infektion einer Maus mit diesem Material wurde später eine Kultur gewonnen, die gleichzeitig mit dem amerikanischen Pferdeimmunserum I und II agglutinierte. Natürlich wurde zunächst an eine Mischkultur gedacht, die entweder im Ausgangsmaterial enthalten oder bei der Passage durch zwei Mäuse infolge einer zufälligen Spontaninfektion eines der betreffenden Tiere mit einem Pneum. II entstanden war. Eine erneute Verimpfung des Exsiccatormaterials hatte aber dasselbe Ergebnis.

Die direkte Züchtung aus dem Exsiccatormaterial durch Überimpfung auf den *Bieling*schen Blutwasseragar (Pferdeblut in Wasser 2 : 1



aufgefangen und mit 50% Agar zu Platten gegossen) ergab Kolonien von verschiedenem Aussehen. Während einige Kolonien trocken und fest in den Nährboden eingegraben waren (Modifikation A), wie das von *Bieling* für typische Pneumokokken verlangt wird, glichen andere den feuchten, leicht mit der Öse abstreifbaren Kolonien, die für Streptococcus haemolyticus charakteristisch sind, von diesen war Modifikation B mehr durchsichtig; Modifikation C stark weiß gefärbt. Diese 3 Modifikationen wurden näher geprüft. Es wurden Reinkulturen in Serumbouillon gewonnen, die bei Wiederverimpfung auf Bielingplatten eine Zeitlang nur eine Modifikation ergaben. Bei Prüfung der Serumbouillonkulturen wurden alle 3 Modifikationen durch amerikanisches Pferdeserum I bis 1 : 100 agglutiniert, Modifikation B und C ebenso hoch durch Serum II, während Modifikation A hier nur bis 1 : 10 ± beeinflußt wurde. In 1 : 20 Natr. taur. wurde Modifikation A in 20 Sek. fast vollständig aufgelöst, Abtötung erfolgte erst nach einer Stunde, Modifikation B und C wurden auch in einer Stunde nicht aufgelöst, dagegen war bei Modifikation B nach einer Stunde Abtötung eingetreten, während C noch nach 24 Stunden lebte (Prüfung durch Aussaat 1 Öse auf Blutagar). Bei Prüfung der Abtötung in 1 : 5 Rindergalle durch Einimpfung von 1 ccm Bouillonkultur blieben Modifikation A, B, C 24 Stunden am Leben, während eine gleichzeitig geprüfte Kultur des Stammes Amerika I (aus Exsiccatormaterial von amerikanischer Sendung) nur nach 10 Minuten noch lebende Keime aufwies, nach 2 Stunden abgetötet war.

Es unterliegt wohl keinem Zweifel, daß es sich hier um reines Material vom Typus I gehandelt hat, das im Exsiccator oder beim Verschicken eine Veränderung ähnlicher Art erfahren hat, wie die beschriebenen Kulturen bei künstlicher Abschwächung. Das wird besonders wahrscheinlich dadurch, daß die aus dem ersten Exsiccatormaterial durch Impfung einer Maus gewonnene Kultur in Serumbouillon nur eine geringe Virulenz besaß. 0,0001 ccm tötete in 2 Tagen eine Maus, 0,00001 nicht mehr.

Die Veränderungen im agglutinatorischen Verhalten unserer Pneumokokkenstämme gingen in den beschriebenen Fällen Hand in Hand mit Verlust der Virulenz, ohne aber völlig parallel damit zu gehen. Diese Veränderungen weisen vielmehr ebenso, wie sich das bei näherem Studium auch für die sonstigen als Mutationen oder Variationen bezeichneten Veränderungen von Mikroorganismen ergeben hat, sowohl bezüglich der Richtung als bezüglich des Grades der eintretenden Veränderung etwas durchaus Unregelmäßiges und Sprunghaftes auf, d. h. wir wissen zwar, daß die Erreger unter bestimmten Bedingungen zur Veränderlichkeit neigen, und daß gewisse Veränderungen oft Hand in Hand gehen, ohne daß wir aber imstande sind, die Gesetzmäßigkeiten, die diesen Erscheinungen natürlich zugrunde liegen, im einzelnen zu erkennen und die



entstehenden Veränderungen im voraus zu berechnen. Das trat auch deutlich zutage bei den von *Bernhardt*[1]) beschriebenen agglutinatorischen Veränderungen von Typhusbacillen, deren anscheinend ganz unregelmäßiges und willkürliches Auftreten in mancher Hinsicht an unsere Befunde erinnert.

Dieselben Bedingungen, unter denen wir eine Abschwächung der Virulenz und die beschriebenen Veränderungen in agglutinatorischer Hinsicht beobachteten, führen nun aber auch zu einer Reihe anderweitiger Veränderungen der Pneumokokken, nämlich in bezug auf die Kapselbildung, das Verhalten gegen gallensaure Salze, gegen Optochin, das Wachstum bei niedrigen Temperaturen, sowie zu teilweise sehr erheblichen morphologischen und kulturellen Abweichungen. Diese Veränderungen werden an anderer Stelle näher behandelt werden; sie stehen insofern alle miteinander in einem gewissen Zusammenhang, als sie häufig gleichzeitig auftreten, ohne daß jedoch eine Veränderung in einer Richtung streng von einer andern abhängig und jedesmal mit ihr vergesellschaftet zu sein braucht. Allerdings besteht offenbar zwischen voller Virulenz und typischem Verhalten bei der Agglutination ein besonders enger Zusammenhang; es erscheint aber doch nicht ganz ausgeschlossen, daß man auch agglutinatorische Veränderungen bei typischen Pneumokokken gelegentlich ohne deutliche Virulenzabschwächung antreffen wird.

Die nachstehende Tabelle gibt die Ergebnisse aller bisher besprochenen Versuche wieder.

## 2. Atypische Agglutination bei Pneumokokken vom Typus II und III.

In derselben Weise habe ich durch Züchtung bei 39° aus verschiedenen Stämmen vom Typus II und III (Mucosus) Varianten gewonnen, die soweit abgeschwächt waren, daß 0,02 bzw. bei einem der 4 veränderten Stämme 0,1 gegeben werden mußten, um eine Maus zu töten. Im Gegensatz zu den meisten der beschriebenen Varianten vom Typus I *wurden die beiden abgeschwächten II-Stämme und der eine der beiden III-Stämme durch Natr. tauroch. (1: 100) nicht mehr gelöst.*

Die agglutinatorischen Veränderungen waren in diesen Fällen noch unregelmäßiger als in den vorher beschriebenen und gingen insofern noch weiter, als je eine Variante des Typus II (Am. II) und III (2584) durch Streptokokkus Aronson-Kaninchenserum nahezu bis zur Titergrenze agglutiniert wurde. Dabei hatte der abgeschwächte III-Stamm seine Agglutinationsfähigkeit für das homologe Kaninchen- und Pferdeserum behalten, während der abgeschwächte II-Stamm sie völlig verloren hatte.

[1]) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 79, 219.



*Tabelle I. Agglutination von Pneumokokken.* 24 stündige Beobachtung bei 37°.

| Sera: Stämme | Virulenz für Mäuse | Pneumokokken I Kaninchen | Pneumokokken I Pferd | Pneumokokken I avirulent Var. A | Pneumokokken II Kaninchen | Pneumokokken II Pferd | Pneumokokken III Kaninchen | Pneumokokken III Pferd | Strept. Aronson Kaninchen | Strept. Aronson Pferd | Str. Aronson av. (virid.) Kaninchen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Amerika I . . . | mindestens 0,0000001 | 1 : 200 + | 1 : 200 + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Wachholz (Typ I) | mindestens 0,0000001 | 1 : 200 + | 1 : 200 + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Amerika II . . . | mindestens 0,0000001 | 0 | 0 | 0 | 1 : 200 + | 1 : 200 + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Amerika III . . | mindestens 0,0000001 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 : 200 + | 1 : 200 + | 0 | 0 | 0 |
| Amerika I Var. A | 0,5 +$_3$ 0,1 lebt | 1 : 25 + | 1 : 25 + | . | 1 : 50 ± | 1 : 100 + | . | . | . | . | . |
| Amerika I Var. B | 0,01 +$_2$ 0,001 lebt | 1 : 25 + | 1 : 100 + | 1 : 400 + | 1 : 25 ± | 1 : 200 ± | 1 : 50 ± | 1 : 200 + | 1 : 10 + | . | 1 : 25 + |
| Amerika I Var. C | 0,5 lebt | 1 : 25 + | 1 : 100 + | 1 : 400 + | 1 : 25 + | 1 : 100 + | 1 : 25 + | 1 : 50 + | 0 | . | 0 |
| Wachholz Var. A abgeschwächt | 0,0001 +$_2$ 0,00001 lebt | 1 : 200 + | 1 : 200 + | 0 | 0 | 0 | 1 : 25 – | 1 : 10 ± | 1 : 25 + | . | 1 : 10 + |
| Wachholz Var. B | 0,3 +$_3$ 0,1 lebt | 1 : 200 + | 1 : 200 + | 1 : 25 + | 1 : 25 ± | 1 : 25 ± | 1 : 25 ± | 1 : 25 + | 0 | . | 0 |
| Wachholz Var. C | 0,5 +$_1$ 0,3 lebt | 1 : 400 + | 1 : 200 + | 1 : 400 + | 0 | 1 : 10 ± | 1 : 25 + | 1 : 100 ± | 0 | . | 0 |
| Strept. Aronson | mindestens 0,00000001 | 0 | 0 | 1 : 10 + | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 : 800 ± | 1 : 50 + | 1 : 25 ± |
| Ders. avir. (viridans) (Var. A.) | 0,5 lebt | 1 : 10 + | 1 : 100 + | 1 : 50 ± | 1 : 50 ± | 1 : 100 + | 1 : 100 + | 1 : 100 + | 0 | 1 : 25 + | 1 : 800 + |

Die übrigen Einzelheiten sind aus den Tabellen II und III zu ersehen. Dabei ist in diesen nicht nur die Verdünnung angegeben, bis zu der Agglutination erfolgte, sondern auch die Qualität der Agglutination, indem drei verschiedene Formen des Agglutinationsphänomens, nämlich das Auftreten einer am Boden haftenden Membran, grobe und feine Flocken unterschieden werden. Im allgemeinen ging dabei die Bildung von Membranen und groben Flocken parallel mit der Stärke der Sera, gemessen an der Verdünnung, bis zu der feine Flocken auftreten.

### 3. Agglutinatorische Veränderungen bei Streptokokken.

Die mitgeteilten Beobachtungen an Pneumokokken geben mir Anlaß, einige ähnliche Versuche auch an Streptokokken anzustellen. Ich gewann zunächst von dem hochvirulenten Streptokokkus Aronson eine avirulente Variante (Var. A), und zwar nach dem Vorgange von *Morgenroth* und seinen Mitarbeitern durch Abimpfung aus der Subcutis einer 4 Stunden vorher mit dem Originalstamm infizierten Maus. Zwischen vielen hämolytischen Kolonien erschienen auf der Platte etwa 10 Viridanskolonien, von denen ich eine abimpfte und näher untersuchte. Die Virulenz war: Maus 0,1 i. per. lebt, Maus 0,5 i. per. †.

In der Tat zeigte dieser Aronson-Viridans-Stamm ähnliche Veränderungen bezüglich der Agglutination, wie ich sie an avirulenten Pneumokokken beobachtet hatte. Der originale Streptokokkus Aronson wurde durch ein Kaninchenserum, das ich durch i. ven. Einspritzung abgetöteter Kultur desselben Stammes gewonnen hatte, in 24 Stunden bis 1 : 400 stark, bis 1 : 800 deutlich agglutiniert. Dieses Serum wirkte auch unverdünnt auf den Viridansstamm gar nicht. Ein von der Fabrik Schering bezogenes Streptokokkenpferdeserum, das den Originalstamm verhältnismäßig schwach, bis 1 : 50 beeinflußte, agglutinierte dagegen den Viridans-Stamm immerhin bis 1 : 25.

Umgekehrt verhielt sich das Serum eines Kaninchens, das ich mit abgetöteter Kultur des Viridans-Stammes i. v. behandelte. Es agglutinierte diesen Stamm bis über 1 : 800 (die Grenze habe ich nicht festgestellt), den Ausgangsstamm Aronson aber nur schwach bis 1 : 25. Auch in diesem Fall verhält sich also die avirulent gemachte Variante dem Ausgangsstamm gegenüber serologisch wie ein fremder Stamm.

Oben wurde schon erwähnt, daß die abgeschwächten Pneumokokkenstämme z. T. eine Agglutination mit Streptokokkensera zeigten. Ich habe nun umgekehrt die verschiedenen Pneumokokkensera auf die Streptokokken einwirken lassen. Dabei ergab sich zunächst, daß der Originalstamm Aronson (virulent) durch keines unserer 6 mit virulenten Pneumokokken gewonnenen Sera beeinflußt wurde, auch nicht durch die unverdünnten Sera; nur das mit der avirulenten Variante des Pneum. Am. I hergestellte Serum agglutinierte ihn schwach (bis 1 : 10).



Ganz anders verhielt sich die avirulente Variante A des Streptokokkus. Sie wurde von allen 3 Pneumokokkenpferdesera (gegen Typus I, II und III) gleichmäßig bis 1: 100 (der halben Titerhöhe) agglutiniert, ebenso von dem Pneum. III-Kaninchenserum, von den beiden anderen (I und II) Kaninchensera, sowie von dem Pneum. I avir. Kaninchenserum schwächer (s. Tab.).

Eine zweite Variante B des Streptokokkus Aronson gewann ich auf anderem Wege, nämlich Züchtung von 39°. Der Stamm war so weit abgeschwächt, daß zwar 0,01 i. p. eine Maus tötete, aber nicht mehr 0,001. Der Stamm wuchs auf Agar etwas schleimig, auf Blutagar wie ein Viridans; diese Variante B wurde im Gegensatz zu der Variante A von dem mit dem Originalstamm gewonnenen Kaninchenserum hoch agglutiniert, nicht aber von dem gegen die avirulente Variante A gerichteten Serum. Er agglutinierte ferner mit allen drei Pneumokokkenpferdesera 1—3 hoch, sogar bis zur doppelten Titerhöhe und auch, wenn auch in verschiedenem Grade, mit dem entsprechenden Kaninchenserum.

Das Nähere ergibt Tabelle IV.

Weitere Streptokokkenstämme habe ich nicht untersucht. Ich möchte aber auf die Befunde von *Neufeld*[1]) hinweisen, der bei abgeschwächten Streptokokken mehrfach eine Veränderung in ganz anderem Sinne beobachtete, indem nämlich die avirulenten Varianten mit denselben Sera wie die virulenten Ausgangsstämme, nur sehr viel stärker agglutinierten. Hiernach dürfen wir annehmen, daß die Streptokokken unter solchen Bedingungen, die geeignet sind, die Virulenz abzuschwächen, neben kulturellen Abweichungen Veränderungen bezüglich ihrer Agglutinabilität in verschiedenen Richtungen erleiden können.

Jedenfalls können im Zusammenhang mit einer Abschwächung der Virulenz nicht nur Pneumokokken, die sich ja oft gleichzeitig dabei in ihrem sonstigen Verhalten (gegen Galle, Optochin, Kapselbildung, Kettenbildung, Wachstum bei Zimmertemperatur) den Streptokokken nähern, serologische Beziehungen zu diesen gewinnen, sondern dasselbe ist umgekehrt auch bei Streptokokken der Fall. Auch diese haben übrigens, wenigstens in unseren Fällen, gleichzeitig mit ihrer serologischen Veränderung in einer Beziehung, nämlich im Wachstum auf der Blutplatte, die Eigenschaften eines Pneumokokkus angenommen.

### 4. Frühere Beobachtungen über atypische Agglutination bei Pneumokokken.

Die ältere Beobachtung von *Neufeld*, wonach Pneumokokken, wenn sie avirulent werden, vielfach ihre Agglutinabilität verlieren, wurde schon oben erwähnt. Aus der kürzlich veröffentlichten Zusammenfas-

[1]) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **44**, 161; **51**, 293, Anm.





*Tabelle II. Atypische Agglutination zweier Pneumokokkenstämme vom Typus II (Rat. u. Am. II).*
M. g. f. bedeutet: Es wurden Membranbildung, grobe Flocken, feine Agglutination abgelesen.

| Sera | | Pneumokokken I | | Pneumokokken II | | Pneumokokken III | | Pneumokokk. avir. (Am. I) | Streptokokkus (Aronson) virulent | Streptokokkus (Aronson) avirulent |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Stamm | Virulenz für Mäuse | Kaninchen M. g. f. | Pferd M. g. f. | Kaninchen M. g. f. | Pferd M. g. f. | Kaninchen M. g. f. | Pferd M. g. f. | Kaninchen M. g. f. | Kaninchen M. g. f. | Kaninchen M. g. f. |
| Rat . . . . . . | 0,1 $\dagger_2$<br>0,02 lebt | 0 | · 50 100+<br>200± | · 200 400± | 200 · 400+ | · · 10+<br>200± | · · 100+<br>400± | · 25 100+ | 0 | 0 |
| Am. II . . . . | 0,02 $\dagger_2$<br>0,01 lebt | 0 | 0 | 0 | 0 | · · 10+<br>25± | · · 25+<br>400± | · · 25± | 50 200 400+ | 0 |

*Tabelle III. Atypische Agglutination zweier Pneumokokkenstämme vom Typus III (Am. III und 2584).*
M. g. f. bedeutet: Es wurden Membranbildung, grobe Flocken, feine Agglutination abgelesen.

| Sera | | Pneumokokken I | | Pneumokokken II | | Pneumokokken III | | Pneumokokk. avir. (Am. I) | Streptokokkus (Aronson) virulent | Streptokokkus (Aronson) avirulent |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Stamm | Virulenz für Mäuse | Kaninchen M. g. f. | Pferd M. g. f. | Kaninchen M. g. f. | Pferd M. g. f. | Kaninchen M. g. f. | Pferd M. g. f. | Kaninchen M. g. f. | Kaninchen M. g. f. | Kaninchen M. g. f. |
| Am. III . . . . | 0,02 $\dagger_2$<br>0,01 lebt | · · 10+<br>25± | · 10 25+ | 0 | · · 10+<br>25± | 25 · 50+<br>100± | 50 100 400±<br>200? | · · 10+<br>25± | 0 | 0 |
| 2584 . . . . . . | 0,02 $\dagger_2$<br>0,01 lebt | · · 50+ | · 50? 100+ | 100 · 200? | 100 · 400+ | · 50? 200+ | 25 100? 400+ | 0 | 400 · · | · · 200+ |

*Tabelle IV. Agglutination eines virulenten und zweier avirulenter Streptokokkenstämme.*
Nur bei Variante B wurde die Unterscheidung zwischen Membranbildung, grober und feinflockiger Agglutination gemacht.

| Sera | | Pneumokokken I | | Pneumokokken II | | Pneumokokken III | | Pneumokokk. aviru. (Am. I) | Streptokokkus (Aronson) virulent | Streptokokkus (Aronson) avirulent |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Stamm | Virulenz für Mäuse | Kaninchen | Pferd | Kaninchen | Pferd | Kaninchen | Pferd | Kaninchen | Kaninchen | Kaninchen |
| Aronson Orig. . | mindestens 0,00000001 } | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10+ | 800± | 25± |
| Variante A . . | 0,5 lebt | 10+ | 100+ | 50± | 100+ | 100+ | 100+ | 50± | 0 | 800+ |
| Variante B . . | 0,01 $\dagger_2$<br>0,001 lebt | M. g. f.<br>· · 10+ | M. g. f.<br>· · 200+ | M. g. f.<br>· 10+ 400+<br>100? | M. g. f.<br>· · 400+ | M. g. f.<br>· 50? 400+ | M. g. f.<br>50 200? 400+ | M. g. f.<br>· · 25+ | M. g. f.<br>400 · · | M. g. f.<br>0 |

sung von *Eastwood*[1]) ersehe ich aber, daß auch von anderer Seite bereits eine Agglutination typischer Pneumokokken mit heterologen Seren beschrieben worden ist.

Die erste Beobachtung und zugleich diejenige, die den meinigen am nächsten steht, stammt von *Laura Stryker*[2]). Die Verfasserin züchtete einen Pneum. I-Stamm längere Zeit in homologem Serum und fand, daß er seine Agglutinationsfähigkeit mit diesem Serum zum großen Teil verlor und dafür durch ein Pneum. II-Serum agglutinierbar wurde; entsprechend agglutinierte ein Stamm vom Typus II nach Züchtung im Typus II-Serum nicht oder nur schwach mit diesem Serum, dagegen mit Typus I-Serum. Gleichzeitig verloren die Stämme ihre Virulenz und ihr antigenes Vermögen. Besonders diese letztere Beobachtung stimmt durchaus mit den unsrigen überein und wir dürfen wohl vermuten, daß die Züchtung im homologen Antiserum nicht einen spezifischen Einfluß, etwa im Sinne einer Festigung gegen die homologen Antikörper, ausgeübt, sondern dadurch gewirkt hat, daß die Erreger unter allgemein ungünstigen Bedingungen, die zugleich zum Virulenzverlust führten, gehalten wurden. Während hier, wie in unserem Falle, atypische Agglutination bei künstlich beeinflußten Kulturen eintrat, handelt es sich bei den folgenden Beobachtungen um Stämme, die anscheinend von Anfang an, sogleich nach der Züchtung aus Krankheitsfällen ähnliche Unregelmäßigkeiten zeigten.

*Blake*[3]) teilt kurz mit, daß eine kleine Anzahl von Kulturen der Gruppe IV in geringem Maße durch die Sera aller 3 Typen (I, II, III) agglutiniert wurde, jedoch unvollständig und langsam.

*Mildred Clough*[4]) fand bei Untersuchung zahlreicher Pneumokokkeninfektionen aus dem Johns Hopkins-Hospital 9 Stämme, die gleichzeitig mit Sera vom Typ I, II und III agglutinierten (1 : 8 bis 1 : 64), präcipitierten und im Phagocytoseversuch beeinflußt wurden; Kontrollen mit Normalserum waren in allen Fällen negativ. Im Castellaniversuch nahm aber jeder dieser Stämme aus einem I- oder II-Serum nur Agglutinine für sich selbst heraus, nicht für Typ I bzw. II und auch nicht für die anderen 8 Stämme, und ebenso erhielt *Clough* durch Immunisierung mit diesen 9 Stämmen Agglutinine nur für den eigenen Stamm. Es handelt sich offenbar um Stämme, die zur sog. Gruppe IV der Amerikaner gehören und eine gewisse Agglutinabilität für I- und II-Sera angenommen haben, sei es schon im menschlichen Körper, sei es bei der Weiterzüchtung.

---

[1]) Reports on public health and medical subjects. Ministery of health. London 1922. Nr. 13.

[2]) Journ. of exp. med. **24**, 49. 1916.

[3]) Journ. of exp. med. **26**, 67. 1917.

[4]) Journ. of exp. med. **30**, 123. 1919.





Es ist wohl anzunehmen, daß sich, wenn man darauf achtet, solche Stämme, wie sie *Blake* und *Clough* beschreiben, öfter finden werden.

*Nicolle* und *Debains*[1]) fanden unter zahlreichen Pneumokokkenstämmen neben typischen Stämmen (hauptsächlich vom Typus II und III) 30% solche, die mit mehreren Sera agglutinierten, wobei meist das Typ II-Agglutinin „dominant" war. Die anderweitigen interessanten Befunde der Autoren seien hier kurz erwähnt. Durch Behandlung mit Salzsäure, Kochen und Neutralisieren (modifizierte Methode von *Porges*) konnten sie zahlreiche Stämme, die sonst nicht agglutinierten, also zur amerikanischen Gruppe IV zu rechnen waren, so verändern, daß sie mit den „typischen" Sera agglutinierten, und zwar ganz überwiegend mit II-Serum. Auch von diesen Stämmen wurden dann aber einige gleichzeitig durch mehrere Sera beeinflußt. Alle Stämme wurden durch Galle gelöst; über die Virulenz ist in dem Bericht von *Eastwood*, dem ich diese Angaben entnehme, nichts bemerkt.

## 5. Die Bedeutung der Befunde.

Die mitgeteilten Befunde sprechen zusammen mit den Ergebnissen, über die ich in der vorhergehenden Mitteilung berichtete, für einen gewissen Zusammenhang der verschiedenen Pneumokokkentypen untereinander und mit den Streptokokken. Es handelt sich aber bei den soeben wiedergegebenen früheren Beobachtungen ebenso wie in unseren eigenen in keinem Falle um eine Umwandlung eines Pneumokokkus vom Typus I in einen solchen vom Typus II oder umgekehrt. Auch die von *Clough* beschriebenen, offenbar zur amerikanischen Gruppe IV gehörigen Stämme sind wesentlich verschieden von den typischen Stämmen, durch deren Sera sie agglutiniert werden. Das zeigen vor allem die Absorptionsversuche und die Beobachtung von *Clough* sowie von uns, daß Immunisierung mit solchen abweichenden Stämmen keine Antikörper gegen typische Pneumokokken ergab. Ferner ist bemerkenswert, daß in den Fällen, die genauer daraufhin untersucht wurden, die atypische Agglutination mit einer wenigstens teilweisen Virulenzabschwächung vergesellschaftet, vielleicht auch dadurch bedingt war. Es wurde aber schon darauf hingewiesen, daß ein solcher Zusammenhang vielleicht nicht immer vorhanden zu sein braucht.

Nun ist es verhältnismäßig leicht, gewisse Veränderungen, insbesondere solche, die man als „regressiv" zu bezeichnen pflegt, wozu auch der Verlust der Virulenz gehört, künstlich zu erzeugen, während andere Veränderungen bisher nur in der Natur beobachtet worden sind. Es ist daher nicht auszuschließen, daß die Pneumokokken unter natürlichen Bedingungen auch andere, weitergehende serologische Veränderungen erleiden können. Man wird dabei nicht sowohl an eine Um-

[1]) Bull. de l'acad. de méd. 1919, S. 843 zitiert nach *Eastwood*.



wandlung eines einmal fixierten Typus in einen andern zu denken haben, als vielmehr an die Möglichkeit, daß saprophytisch auf der Rachenschleimhaut wuchernde Pneumokokken, wenn sie bei herabgesetzter Widerstandskraft des Körpers in die Gewebe eindringen und zu Krankheitserregern werden, zugleich auch die Eigenschaften eines typischen Pneum. I oder II erwerben oder etwa eine entsprechende latent vorhandene Anlage ausbilden. Die Frage, ob etwas Derartiges möglich ist und ob es vielleicht sogar sehr häufig vorkommt, diese Frage wird durch die vorliegenden Beobachtungen nicht gelöst. Sie ist aber epidemiologisch von großer Bedeutung; von ihrer Beantwortung hängt es ab, ob wir an der Anschauung festhalten können, daß die Pneumonie in der Regel als Folge einer Erkältungs- oder sonstigen Schädigung durch die in jedem Rachen vorhandenen Pneumokokken entsteht, die dabei dann neue Eigenschaften annehmen würden, oder ob wir der Ansicht derjenigen Forscher folgen sollen, die davon ausgehen, daß die weitaus häufigsten Pneumonieerreger, die Kokken des Typus I und II sich fast nie bei Gesunden finden, es sei denn bei solchen, die mit Pneumoniekranken in Berührung gekommen sind, und die daraus folgern, daß eine solche Übertragung in den allermeisten Fällen die Vorbedingung zur Entstehung einer Pneumonie sei und daß sie durch entsprechende Vorbeugungsmaßnahmen nach Möglichkeit verhindert werden müsse. Vorläufig werden wir zur Klärung dieser Fragen neben dem Experiment die epidemiologische Beobachtung nicht entbehren können.

Bei der Typendiagnose der Pneumokokken wird man nach den mitgeteilten Beobachtungen eine gewisse Vorsicht zu üben haben. In den allermeisten Fällen wird nach wie vor der einfache Agglutinationsversuch entscheidend sein. Derselbe wird zweckmäßig, wie es schon bisher sowohl im Rockefeller- wie im Kochschen Institut geschehen ist, in der Weise angestellt, daß das Sputum einer Maus eingespritzt und der Peritonealinhalt unmittelbar zur Agglutination benutzt wird; so wird einer Virulenzverminderung und damit der Möglichkeit einer serologischen Veränderung am besten vorgebeugt. Bei Stämmen, die unter ungünstigen Bedingungen fortgezüchtet und die nicht hochvirulent sind, wird man aber darauf achten müssen, ob sie mit einem andern Serum mit agglutinieren, wenn auch nur ganz schwach. Dann wird man sie mit Sera aller drei Typen quantitativ, vom unverdünnten Serum beginnend austitrieren, wenn möglich sowohl mit Pferde- wie Kaninchensera und wenn noch Zweifel bleiben, den Absorptionsversuch heranziehen und eventuell mit dem zweifelhaften Stamm ein Serum herstellen.

**Schlußsätze.**

1. Typische Pneumokokken erleiden anscheinend regelmäßig serologische Veränderungen, wenn sie unter Bedingungen gehalten werden,



die zu einem Virulenzverlust führen, wie Oberflächenkulturen auf ungeeigneten Nährböden, Züchtung bei 39°, zu weit gehende Austrocknung im Exsiccator.

2. Die Veränderungen bestehen in weitgehender Verminderung der Agglutination mit homologen Sera und im Auftreten einer neuen Agglutinabilität für heterologe Sera. Auch durch Streptokokkensera werden solche veränderten Stämme bisweilen in gewissem Grade agglutiniert.

3. Die Veränderungen treten unregelmäßig und sprunghaft auf, sie gehen auch nicht dem Grade der Virulenzabschwächung parallel.

4. Serologische Veränderungen können sich bereits bei Stämmen finden, die noch in Dosen von 0,0001 ccm Mäuse akut töten.

5. Ein Immunserum, das mit derart veränderten Pneumokokken gewonnen war, agglutinierte nur die betreffende Variante, nicht den (virulenten) Ausgangsstamm.

6. Aus einem hochvirulenten Streptokokkus wurden auf verschiedene Weise 2 avirulente Varianten gewonnen, die mit mehreren Pneumokokkensera, teilweise bis zur Titerhöhe agglutinierten. Die eine Variante hatte gleichzeitig die Agglutinabilität für das mit dem (virulenten) Ausgangsstamm erzeugte Serum verloren.



(Aus dem Institut „Robert Koch“ [Abteilungsleiter: Dr. Schiemann].)

# Reagensglasversuche über die Wirkungen von Acridin- und anderen Farbstoffen auf Bakterien.

Von
Dr. **O. Schiemann** und Dr. **W. Baumgarten.**

## *I. Frühere Versuche.*

Außer ihrer eigentlichen färberischen Wirkung kommt einer großen Zahl von Farbstoffen eine stark entwicklungshemmende und abtötende Wirkung auf Bakterien zu, und zwar wirken die Farbstoffe, wie schon *Behring* erkannt hat, auffallend stark elektiv. Diese Eigenschaft haben sie mit den bisher bekannten chemotherapeutischen Substanzen gemein.

In den 90er Jahren wurde von *Stilling* der Versuch gemacht, Anilinfarbstoffe in die Therapie bakterieller Affektionen am Auge und überhaupt lokaler Art auch am übrigen Körper einzuführen. Das gab Veranlassung zu einer großen Zahl von Arbeiten über die antiseptischen Eigenschaften von Farbstoffen. Eine kritische Würdigung dieser älteren Literatur findet sich bei *Eisenberg* und bei *Römer*, *Gebb* und *Löhlein*.

Von neueren Arbeiten sei *Churchmann* erwähnt, der 1912 eine große Zahl von grampositiven und gramnegativen Bakterien untersuchte. Er fand, daß mit wenigen Ausnahmen die ersteren auf Agarplatten mit einem Gehalt von 1 : 100 000 Gentianaviolett nicht wuchsen, während gramnegative üppig gediehen. Ebenso konnten 48stündige Bouillonkulturen durch einige Tropfen konzentrierter Gentianaviolettlösung schnell gefärbt und abgetötet werden, wenn es sich um grampositive Arten handelte. Er hält die Scheidung der Bakterien in violettpositive und violettnegative nach ihrer Hemmung durch Gentianaviolettagar für ein grundlegendes biologisches Charakteristicum und findet diese Reaktion in Hinblick auf Präzision und Konstanz der Gramfärbung überlegen, der sie im übrigen parallel verläuft. Von 130 untersuchten Spezies verhielten sich 77 grampositiv, davon 70 violettpositiv, 7 violettnegativ; 53 verhielten sich gramnegativ, davon 45 violettnegativ. In einer zweiten Arbeit (1913) stellte *Churchmann* fest, daß prinzipiell wie Gentianaviolett sich auch andere Triphenylmethanfarbstoffe verhielten: nämlich Dahlia, Parafuchsin, Magenta, Pararosanilin, Krystallviolett, Methylviolett 5 B. Die Stoffe wurden diesmal nur in ihrem Verhalten gegenüber Typhus- und Coli-

bacillen einerseits, Milzbrandbacillen und Staphylokokken andererseits untersucht.

Eingehend hat *Eisenberg* (1913), dessen Arbeit zahlreiche nähere Literaturangaben enthält, über die hemmende Wirkung einer großen Zahl von Farbstoffen berichtet. Seine Versuche behandeln die Ursachen der Elektivität der Farbstoffwirkung, die in erster Linie auf die besonders zur Aufnahme der Farbstoffe geeignete Struktur der grampositiven Bakterien zurückgeführt wird.

Diese Arten werden 3—10 000 mal stärker beeinflußt als gramnegative. Einen inversen Typus fand *Eisenberg* allerdings in der Wirkung der Alkalisalze der Pikrinsäure, die gramnegative Arten stark und viel höher als grampositive beeinflußten. Die Ergebnisse wurden durch Entwicklungshemmungsversuche an Oberflächenkulturen auf mit Farbstoff versetzten Agarnährböden gewonnen; Untersuchungen in Bouillon hält *Eisenberg* nicht für zweckmäßig, da hier Verschlechterungen des Nährbodens infolge von Fällungen durch den Farbstoffzusatz in Betracht zu ziehen sind.

Nach Vitalfärbungsversuchen waren die grampositiven Bakterien allein permeabel für die Farbstoffe und fähig, sie zu speichern. Bei den Farbstoffen fand *Eisenberg* ihre Natur als hochmolekulare aromatische Körper entscheidend für ihre Giftigkeit; die Leukoverbindungen (z. B. des Fuchsin) waren in schwächerem Grade, aber ebenfalls elektiv wirksam. Einführung von Silber oder Quecksilber in das Farbstoffmolekül hob in 2 untersuchten Fällen (Eosinderivate von *Glück* angegeben) die Elektivität auf oder verwischte sie fast völlig. Für die Toxizität und Permeabilität war die Farbennuance (das optische Verhalten) ohne Bedeutung, nur die Farbstärke (intensives Färbevermögen) erwies sich von Einfluß; Lipoidlöslichkeit und kolloidaler Charakter (Dispersitätsgrad) kommen nach *E.* nicht in Betracht. Ausgesprochen basische oder saure Farbstoffe waren wirksam, nicht dagegen Sulfosäurefarbstoffe, die nach *Freundlich* infolge Einführung der Sulfogruppe ihre Adsorptionsfähigkeit einbüßen. Bei Zusatz von $^1/_3$ Ascites zum Agar wurde Krystallviolett im Gegensatz zu anderen Farbstoffen nicht in seiner Wirkung abgeschwächt. Bakterien mit zartem Wachstum (Hühnercholerabacillen, Micrococcus melitensis, B. violaceum) sowie mit großen Ansprüchen an den Nährboden, und zwar sowohl grampositive wie gramnegative Arten wurden bei diesen Vergleichen ausgeschaltet. Micrococcus catarrhalis, Meningokokken und Gonokokken wurden wegen ihrer Permeabilität bei Anfärbungsversuchen hier zu den grampositiven Arten gerechnet. Innerhalb beider Gruppen von Bakterien ließ sich folgende konstante Reihenfolge in der Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber allen Farbstoffen aufstellen: Pyocyaneus $<$ Coli $<$ Typhus $<$ Friedländer $<$ Cholera, Staphylokokken $<$ Pseudodiphtherie $<$ Tetragenus $<$ Milzbrand $<$ Diphtherie. Aerobe Sporenträger erwiesen sich als besonders empfindlich, bei Einsaat von Milzbrandsporen ergab der Entwicklungshemmungsversuch stärkere Beeinflussung als die Einsaat von sporenfreien Stäbchen.

Dann untersuchte *Shiga* (1913) die Frage der Arzneifestigkeit von Bakterien gegen Farbstoffe und fand dabei in vitro neben anderen Farbstoffen Trypaflavin als stark wirkendes Antisepticum gegen Cholerabacillen. Die Grenze für Entwicklungshemmung in Bouillon lag durchschnittlich bei 1 : 300 000, war aber, worauf wir noch zurückkommen, starken Schwankungen ausgesetzt. Die Beobachtung der Abtötung in Kochsalzlösung bis zu 3 Stunden ergab regelmäßigere Resultate.



Ebenfalls 1913 haben *Browning* und *Gilmour* mit Acridinverbindungen und Triphenylmethanfarbstoffen Entwicklungshemmungsversuche gegenüber verschiedenen Bakterien angestellt.

In dieser Arbeit wurde in erster Linie eine sehr hohe desinfizierende Kraft von Triphenylmethanfarbstoffen gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien — nicht jedoch gegenüber der Typhus-Coligruppe — festgestellt, über die Acridinverbindungen wird nur mitgeteilt, daß ihre Wirkung gegenüber Milzbrandbacillen, malignem Ödem, Colibacillen und Staphylokokken im Serum gesteigert ist. Weiterhin haben *Browning* und seine Mitarbeiter für Acridinverbindungen die Förderung ihrer keimtötenden Wirkung durch Serum studiert und mit Sublimat verglichen. Während Sublimat in 0,7% Peptonwasser auf Staphylokokken 100 mal stärker wirkte als in Kaninchenserum, wirkten Trypaflavin und Diaminoacridinsulfat in Serum 10 mal besser (Abtötung bei 1 : 200 000), bei Colibacillen steigerte sich die Wirkung der Diaminoacridinsulfate sogar in 2 Versuchen von 1 : 1300 bzw. 1 : 4000 — in Pepton auf 1 : 100 000 — in Serum also auf das 25—70 fache. Die Steigerung trat in aktivem wie inaktivem Serum in gleicher Weise auf. Die Endwirkung wurde aber viel später erreicht als beim Sublimat, das mit 1 : 10 000 nach 2 Stunden wie nach 24 Stunden bei beiden Bakterienarten gleich stark wirkte, während Trypaflavin beide nach 2 Stunden bis 1 : 20 000, Colibacillen nach 24 Stunden bis 1 : 100 000, Staphylokokken bis 1 : 200 000 abtötete (in inaktivem Kaninchenserum).

Von Reagensglasversuchen seien weiterhin die von *Erna Fürstenau* hervorgehoben. *Fürstenau* fand außerordentlich hohe Werte für die Aufhebung der Entwicklung durch Trypaflavin gegenüber den untersuchten Bakterien, während die nach $2^1/_2$ Stunden festgestellte Abtötung meist recht niedrige Zahlen aufwies. So ergab sich für Staphylokokken Entwicklungshemmung in Serumbouillon bei 1 : 2 Million, Abtötung bei 1 : 4000, für Pneumokokken Entwicklungshemmung bei 1 : 200 000, Abtötung bei 1 : 400, für Gonokokken Entwicklungshemmung bis 1 : 50 Million, Abtötung bei 1 : 80 000, die 10fach geringere Konzentration ergab Wachstum.

Die Mitteilungen von *Neufeld* und *Schiemann* und *Neufeld, Schiemann* und *Baumgarten* fußen, soweit sie sich auf in vitro-Versuche beziehen, auf den hier mitzuteilenden Protokollen. Sie betrafen die bactericide und entwicklungshemmende Wirkung von Trypaflavin gegen 17 verschiedene Bakterienarten. Sie bestätigen u. a. die Steigerung der Wirkung des Trypaflavins auf Staphylokokken in Serum gegenüber der in Bouillon, doch heben sie hervor, daß auf Hühnercholerabacillen, die bereits in Bouillon von Trypaflavin sehr hoch beeinflußt werden, die Kombination Serum-Trypaflavin keinen stärkeren Einfluß ausübt. Ferner teilen sie mit, daß bei diesen Versuchen große Schwankungen in dem Ergebnis der Entwicklungshemmungsversuche in Bouillon bei einigen Bakterien auffielen.

*Burkard* und *Dorn*, die ebenfalls eine große Anzahl von Bakterien auf ihre Empfindlichkeit gegen Trypaflavin prüften, erhielten folgende Zahlen bei Entwicklungshemmungsversuchen: 1 : 20 000 für Coli-

bacillen, 1:50—100000 für Staphylokokken, 1:100000 für Typhus- und Cholerabacillen, 1:500000 für Milzbrandbacillen, Rotlauf, Shigabacillen, 1:1 Million für Diphtheriebacillen, 1:2 Millionen für Streptokokken.

Bei Nachprüfung der *Browning*schen Angaben über Steigerung der Wirkung des Trypaflavins durch Serum, wobei sie Menschenserum verwendeten, die sie mit Bouillon halb und halb verdünnten, fanden sie eine Steigerung — um das $2^1/_2$fache — nur gegenüber Colibacillen; Staphylokokken, Diphtheriebacillen und Streptokokken wurden nicht stärker, Streptokokken sogar etwas schwächer beeinflußt. In Abtötungsversuchen mit Diphtheriebacillen fanden sie in NaCl-Lösung schnellere Abtötung als im Menschenserum. In Übereinstimmung mit *Browning* heben sie ferner hervor, daß die Abtötung durch Trypaflavin überhaupt im Vergleich zu der starken entwicklungshemmenden Kraft langsam vor sich gehe. Ähnlich hohe Zahlen für Entwicklungshemmung durch Trypaflavin besonders gegenüber Streptokokken haben auch andere Autoren mitgeteilt. Dagegen beschränken sich die Mitteilungen von *Browning* und seinen Mitarbeitern bezüglich der *Streptokokken* auf einen Versuch mit sehr geringer Beeinflussung: 1 : 10 000 in Peptonwasser, in Serum 1 : 40 000. Allerdings geben sie an, daß es sich um besonders widerstandsfähige „Enterokokken" handelte.

In neuerer Zeit hat *Langer* eine Reihe von Acridinderivaten in vitro untersucht. Er fand in einem höheren Homologon des Trypaflavins, dem Flavicid, einen elektiv auf Staphylokokken und in noch höherem Grade auf Diphtheriebacillen wirksamen Farbstoff. Die Überlegenheit des Flavicid über das Trypaflavin trat besonders in Abtötungsversuchen zutage, während die Entwicklungshemmung nur unbedeutend stärker ausfiel. Bei Diphtheriebacillen erfolgte Hemmung durch Trypaflavin bei 1:1 Million, durch Flavicid bei 1:2 Millionen, Abtötung in 24 Stunden dagegen durch ersteres bei 1:200 000, durch letzteres bei 1:1 Million.

Nach *Langers* Untersuchungen sind die höheren Homologen der Acridinreihe weniger dispers als die niederen, und ein gewisser Grad von künstlicher Dispersitätsänderung des Mediums kann auch die niederen Homologen wirksamer machen.

Ähnliche Verhältnisse wie in der Acridinreihe fand *Langer* auch in der Chininreihe ausgeprägt: Vuzin tötet Staphylokokken viel schneller ab als Optochin und ist als höheres Homologon weniger dispers. Nach *Langer* sind sowohl die von *Neufeld*, *Schiemann* und *Baumgarten* hervorgehobenen Schwankungen in dieser Richtung zu deuten, indem die Beeinflussung der Submikronen des Farbstoffes schon bei geringen Schwankungen des Mediums eintritt, als auch die Steigerung der Wirkung des Trypaflavins im Serum dadurch zu erklären, daß erst im Serum das Optimum der Dispersität erreicht wird. Bei längerem Kontakt mit Serum kann das Optimum überschritten werden und die Wirksamkeit abnehmen.

Für letztere Beobachtung findet sich ein Analogon in der Angabe *Reicherts*, daß alte Lösungen von *Magentarot* ihren Dispersitätsgrad



verringern und damit ihre antiseptische Kraft fast ganz einbüßen. Für eine optimale Wirksamkeit der Verringerung des Dispersitätsgrades findet sich in den Untersuchungsergebnissen dieses Autors aber kein Anhaltspunkt.

*Reichert* untersuchte von grampositiven Mikrorganismen Milzbrand und Hefe, von gramnegativen Typhusbacillen und stellte ebenso wie *Eisenberg* einen Parallelismus zwischen schneller Anfärbung und starker bactericider Wirkung der Farbstoffe fest. Bei vergleichenden Untersuchungen in elektrolytfreier 2,5 proz. Traubenzuckerlösung, in der sich die Farbstoffe klar lösten, in physiologischer Kochsalzlösung und in Bouillon, in welchen Medien bei mikroskopischer Betrachtung die grobe Dispersität der Farbstoffpartikel festzustellen war, ergab sich der günstigste Färbe- und antiseptische Effekt in Traubenzuckerlösung, der schlechteste in Bouillon. Am deutlichsten traten die Unterschiede bei Anwendung violetter Farben (Viktoriablau, Pyoctanin, Dahliablau, Methylviolett, Anilinviolett und Magentarot) und des Typhusbacillus zutage. Bei Milzbrandbacillen, die viel schneller angefärbt und durch geringe Konzentrationen abgetötet werden, war nur in einzelnen Fällen durch Bouillonkolloide eine solche störende Wirkung nachweisbar. Nach *Reichert* findet man bei Verfolgung des Färbeprozesses in NaCl-Lösung Farbstoffkügelchen an die ungefärbten Bakterien adsorbiert, die sie im Laufe einer Stunde aufnehmen, wonach die Bakterien gefärbt, die Lösung klar erscheint, in Bouillon fehlt dagegen die Adsorption und Aufnahme des Farbstoffes in der Regel, da sie wie ein Schutzkolloid die Bakterien umhüllt und von den Farbstoffkügelchen trennt.

### *II. Die Schwankungen der Ergebnisse bei vitro-Versuchen mit Farbstoffen.*

Auffallend bei unseren Versuchen ist, daß die Wirkung des Trypaflavins so hohen Schwankungen ausgesetzt ist. Das ist schon von *Shiga* nachdrücklich hervorgehoben worden, während die späteren Untersuchungen darüber meist keine Angaben enthalten. Es trifft übrigens, wie schon von *Neufeld*, *Schiemann* und *Baumgarten* hervorgehoben wurde, auch auf eine Anzahl anderer Farbstoffe, zum Teil sogar in noch höherem Maße zu (s. Chinolinrot S. 264). Diese Schwankungen boten eine große Schwierigkeit bei Festsetzung der für die Gesamtübersicht der Ergebnisse unserer Versuche auszuwählenden Zahlen, die in Tabelle I gegeben ist.

Jedenfalls werden bei Benutzung ein und desselben Nährbodens und gleichzeitiger Prüfung einer Reihe von Substanzen gegenüber den aus ein und demselben Kulturröhrchen entnommenen Bakterien Fehler am ehesten vermieden werden. In dieser Weise haben wir nun zunächst das Trypaflavin mit den übrigen 3 · 6-Diaminoacridinverbindungen verglichen und von den Versuchen mit anderen Stoffen in erster Linie diejenigen verwertet, bei denen Trypaflavin oder eines seiner Verwandten gleichzeitig geprüft worden waren. Nicht alle Präparate wurden allerdings in dieser Weise vergleichend geprüft; in diesen Fällen wurde denjenigen Versuchen der Vorzug gegeben, in denen wenigstens mehrere Präparate gleichzeitig geprüft waren. Wichtige Versuche wurden stets mehrfach wiederholt. Besondere Versuchsanordnungen kamen bei einer Anzahl von Bakterien zur Anwendung, nämlich: die Prüfung einer größeren Anzahl von Stämmen der gleichen

Bakterienart, die Prüfung des gleichen Stammes mit verschieden großer Einsaat und die Prüfung in Nährböden verschiedener Zusammensetzung.

Auf den ungleichen Ausfall von Entwicklungshemmungs- und Abtötungsversuchen durch Farbstoffe bei Prüfung verschiedener Stämme derselben Bakterienart haben besonders *Römer*, *Gebb* und *Löhlein* hingewiesen, die sämtliche wasserlöslichen Farbstoffe der Firma *Merck* bezüglich ihrer Wirkung auf augenpathogene Keime untersuchten. Sie empfehlen aus diesem Grunde zu desinfektorischen und therapeutischen Zwecken die Anwendung von Farbstoffgemischen. Daß auch ein und derselbe Stamm bei Übergang in einen neuen Nährboden andere Resultate gegenüber dem gleichen Antisepticum ergeben kann, haben *Morgenroth* und *Bieling* mit Isoctylhydrocuprein und anderen Homologen bei Untersuchung der Gasbrandbacillen erfahren. *Eisenberg* berichtet nicht über Schwankungen, hat aber seine Versuche nicht in Bouillon, sondern in Agar angestellt.

*Shiga*, der bei seinen Versuchen an Choleravibrionen große Unregelmäßigkeiten erlebte, zieht die von ihm beobachtete Eigentümlichkeit der Choleravibrionen, schnell eine Arzneifestigkeit gegen den Farbstoff zu gewinnen, als Erklärung heran. Er gibt an, bei Abtötungsversuchen in Kochsalzlösung, wenn er die Beobachtung nicht länger als auf 3 Stunden ausdehnte, regelmäßige Ergebnisse erzielt zu haben. Diese Festigung war allerdings nur von kurzer Dauer, jedoch ließ sich bei Fortzüchtung in Farbstoffbouillon mit steigender Konzentration in 12—20 Generationen eine dauernde Festigung erreichen, wonach die Bakterien 100 mal höhere Konzentrationen von Trypaflavin ertrugen, während dieselben Kulturen nur in weit geringerem Grade gegen andere Farbstoffe widerstandsfähiger geworden waren. Hierdurch wurde es wahrscheinlich gemacht, daß es sich auch bei den Schwankungen um eine spezifische Reaktion der Bakterien handelte. *Fürstenau* hat an Gonokokken ebenfalls eine Arzneifestigkeit gegen Trypaflavin beobachtet, während *Browning* und Mitarbeiter (an Staphylokokken?) bei 6 monatiger Züchtung auf Trypaflavin enthaltenden Medien keine Festigung erzielten. Auch wir haben, und zwar mit einem unbeweglichen, aber gut virulenten Stamm von Choleravibrionen, Cholera 3, einige Versuche in dieser Richtung angestellt, die aber zu keinem befriedigenden Ergebnis kamen, da der in gleichen Zeiträumen in dieselbe Bouillon fortgeimpfte Ausgangsstamm ebenfalls einen hohen Grad von Resistenz zeigte. Der Stamm, der früher bei Verdünnung 1 : 300 000—1 000 000 in Trypaflavinbouillon nicht anging, zeigte jetzt bei 1 : 10 000 noch Wachstum.

Wir haben aber, wie die folgenden Beispiele zeigen werden, nicht nur bei Trypaflavin, sondern auch bei einer ganzen Anzahl anderer Substanzen ebenfalls starke Schwankungen in der Wirksamkeit im Re-



agensglas gefunden. Neben den schon erwähnten Momenten sehen wir einen besonders wichtigen, bisher nicht genügend berücksichtigten Grund dafür in bakterienfeindlichen Eigenschaften der benutzten Nährböden. Auch der vielbesprochene fördernde Einfluß des Kaninchenserums auf die Wirksamkeit des Trypaflavins gegenüber Colibacillen und Staphylokokken ist u. E. in der Hauptsache auf die bactericiden Eigenschaften des Serums gegenüber diesen Bakterien zurückzuführen. Wie schon oben erwähnt, ließ sich bei Untersuchung von Hühnercholerabakterien, die in Kaninchenserum sehr gut wachsen, kein verstärkender Einfluß des Serums auf die Trypaflavinwirkung nachweisen.

Hiernach ist es bei den elektiv wirkenden Substanzen besonders schwierig, im Reagensglasversuch die Grenzen der bakterienfeindlichen Konzentrationen genauer festzustellen, daher muß für die große Übersichtstabelle, deren Zahlen zum Teil nur in wenigen Versuchen gewonnen wurden, ein gewisser Vorbehalt gemacht werden.

*III. Bemerkungen über die chemische Natur der untersuchten Präparate.*

Vor Mitteilung unserer Vitroversuche sei über die dabei benutzten Präparate folgendes bemerkt.

Von den Farbstoffen enthalten Nr. 1—11 den Acridinring, der aus drei kondensierten Ringen so zusammengesetzt ist, daß ein Pyridinring beiderseits von einem Benzolring umgeben ist. Kondensierte Benzolringe enthalten auch Trypanrot (Nr. 20) und Trypanblau (Nr. 21), jedoch zusammen mit Naphthalinringen und Benzidinringen

= Benzidin = Naphthalin.

Nr. 22 (Chinolinrot) enthält den Isochinolring, Nr. 23 (Chinolingelb) den Chinolinring.

—N = Isochinolin N = Chinolin.

Nr. 12—19 enthalten 3 Benzolringe, die aber in der Weise aneinandergekettet sind, daß sie 3 H-Atome in einem Methanmolekül substituieren.

C = Triphenylmethan.

Wie bekannt, unterscheidet man an Farbstoffen als chromophore Gruppen diejenigen Atomgruppierungen, deren Eintritt in die Verbindung den Absorptionsstreifen aus dem unsichtbaren Teil des Spektrums in den sichtbaren verschiebt. Auch ohne Eintritt neuer Atome kann andersartige Verkettung derselben, „chinoide" statt „benzoide" Bindung der Kohlenstoffatome im Benzolring denselben Effekt haben. Bei den Farb-

stoffen der Acridin- und Triphenylmethanreihen wird eine chinoide Bindung angenommen. Die beiden Gruppen gehören also insofern zusammen.

Die zu den Triphenylmethanfarbstoffen zugehörigen Basen (Leukobasen) sind keine Farbstoffe, sondern nur die Salze, was durch Übergang der „chinoiden“ Bindung des Benzolkerns bei den Salzen, in die „benzoide“ bei den Basen erklärt wird. Die Acridinbasen sind dagegen Farbstoffe. Wie bereits mitgeteilt, gibt *Eisenberg* an, daß die Leukoverbindungen (z. B. das Fuchsin im Endoagar gegenüber Luftkeimen) ihre elektive Wirkung, wenn auch in abgeschwächtem Grade, behalten. Er bringt aber mit Recht in erster Linie die Giftigkeit in Zusammenhang mit der Zugehörigkeit der Farbstoffe zu den hochmolekularen, aromatischen Körpern (also mit dem Besitz eines Benzol-Pyridin-Naphthalin- usw. Ringes).

Der saure oder basische Charakter der Farbstoffe kommt durch Anlagerung der sog. Auxochrome (meist $NH_2$- oder OH-Gruppen) oder durch Einführung einer Sulfosäure in das Farbstoffmolekül zustande.

Bekanntlich haben isomere Verbindungen nicht die gleiche Wirkung, es ist daher bei Angabe der Konstitution nötig, die Stellen des Ringes, die durch Seitenketten besetzt sind, zu bezeichnen, was durch einheitliche Numerierung geschieht.

Z. B. Numerierung des Acridinringes:

8 9 1
7 2
6 3
5 10 4

Gewöhnlich wird nur das Auxochrom auf diese Weise angegeben, z. B. Nr. 5 als 3·6 Diaminoacridin

CH
$CH_3$ $CH_3$
$NH_2$ $NH_2$
N

(vollständig: 3·6 Diamino – 7·2 Dimethylacridin).

Nr. 2—4 sind die Salze dieser Base.

Neutral-Trypaflavin ist 10 Methyl 3·6 Diaminoacridinchlorhydrat:

$H_3C$ $CH_3$
$H_2N$ $NH_2$
N
$CH_3$ Cl

Bei Nr. 6, dem Diacetodiaminoacridin, sind 2 Essigsäurereste in das alkylierte Diaminoacridin eingeführt. Nr. 7, das Argoflavin, ist durch Einführung von Silber in das Molekül des Trypaflavin gewonnen. Nr. 8, Acridinorange (Nr. 0) unterscheidet sich von Nr. 5 dadurch, daß es in der Amidogruppe doppelt methyliert und ein Chlorzinkdoppelsalz ist. Aurophosphine sind alkylierte Acridinfarbstoffe; die von uns benutzten Präparate Nr. 9 und 10 sind in den Farbstofftafeln von *Schultze* nicht genannt.

Nr. 11, Chrysanilin, ist ein asymmetrisches Diaminophenylacridin, wobei ein $NH_2$ am Acridinring, das andere der aromatischen Seitenkette angefügt ist.

Von den Triphenylmethanfarbstoffen gehören Nr. 12—16 der Fuchsinfamilie, Nr. 17—19 der Malachitgrünfamilie an. Die erste Gruppe wird von Triaminotriphenylmethan, die Malachitgrünfamilie von Diaminodiphenylmethan abgeleitet. Die erstere enthält also 3 $NH_2$-Gruppen, die letztere 2 als Auxochrome. Nr. 12, das Parafuchsin, ist nicht alkyliert, Nr. 13, das Tryparosan, wurde durch Einführung eines Halogenrestes (Cl) in das Parafuchsinmolekül von *Benda* gewonnen und war nach *Ehrlich* für Mäuse weniger als halb so giftig, wie das Parafuchsin und wirksamer bei der experimentellen Trypanosomeninfektion. Nr. 14, Methylviolett, ist alkyliert, Nr. 15, Krystallviolett, in allen 3 $NH_2$-Gruppen methyliert. Nr. 16, Dahlia, ist ein Gemenge von niedriger oder höher methylierten Fuchsinen, erhalten durch Einwirkung von Halogenalkylen auf Fuchsin.

In der Malachitgrünfamilie haben Nr. 17, Neu-Viktoriagrün, und 18, Malachitgrün, die gemeinsame Leukobase $C_6H_5 < \begin{smallmatrix} C_6H_4N(CH_3)_2 \\ C_6H_4N(CH_3)_2 \end{smallmatrix}$. Malachitgrün ist das Chlorzinkdoppelsalz, Neu-Viktoriagrün das Oxalat. Das Brillantgrün, Nr. 19, ist analog gebaut, aber äthyliert.

Die übrigen Farbstoffe gehören ganz fernliegenden Gruppen an. Trypanrot Nr. 20 und Trypanblau Nr. 21 sind tetrazotierte Benzidinverbindungen. Sie gehören zur Gruppe der Congofarbstoffe und sind bekanntlich gegen Trypanosomen chemotherapeutisch wirksam. Gegenüber Bakterien sind beide nur sehr schwach wirksam, doch berichtet *Reichert*, daß ein anderer Azofarbstoff, das Chrysoidin, starke Wirksamkeit besaß.

Nr. 22, das Chinolinrot, und Nr. 24, das Chinolingelb, sind durch den Besitz des Chinolinringes gekennzeichnet. Das Chinolingelb ist ein Ketonfarbstoff und entsteht durch Zusammenschmelzen von Chinaldin und Phthalsäureanhydrid, enthält also den Benzolring und den Chinolinring. Das Chinolinrot ist ein Isochinolinderivat unbekannter Konstitution.

### *IV. Elektive Wirkung verschiedener Farbstoffe in vitro.*

Es sollen nun zunächst die Ergebnisse der Entwicklungshemmungsversuche, wie sie sich in Tabelle I darstellen, besprochen werden, darauf die Abtötungsversuche, alsdann die Ursachen für die Schwankungen in dem Ausfall der Versuche.





*Tabelle 1.*

**Grenzzahlen der Entwicklungshemmung in Bouillon (bzw. Serumbouillon für**

| | a | b | c | d | e | f | g | h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Friedländer-bacillen | Coli-bacillen | Typhus-bacillen | Proteus-bacillen | y-Ruhr-bacillen | Influenza-bacillen | Pest-bacillen | Staphylo-kokken |
| 1. Neutrales Trypaflavin | 2500– | 16000– | 10000– | 10000 ± | 30000– | 10000+ | 10000– (20000+) | 50000– |
| 2. 3,6 Diamino-Acrid.-Nitrat | 10000+ | 3000– | · | · | · | · | 10000– (20000+) | 30000– |
| 3. 3,6 Diamino-Acrid.-Sulfat | 10000+ | · | · | · | · | · | · | · |
| 4. 3,6 Diamino-Acrid.-Chlor. | · | · | · | · | · | · | · | · |
| 5. 3,6 Diamino-Acridin-Base | 10000+ | · | · | · | · | · | 20000– (40000+) | · |
| 6. Diaceto-Diamino-Acridin alkyliert | · | 10000+ | 10000+ | · | · | · | · | · |
| 7. Argoflavin | · | · | 30000 ± | · | · | · | · | · |
| 8. Acridin-orange N. o. | 5000– | 5000– | 5000– | · | 5000– | 10000– | · | · |
| 9. Aurophosphin g extra | · | 10000+ | 10000+ | · | 10000+ | 10000– | · | · |
| 10. Aurophosphin 4 g extra | · | 10000+ | 10000+ | · | 10000+ | 100000– | · | · |
| 11. Chrysanilin-(Phosphin extra) | · | · | · | · | 10000+ | 10000+ | · | · |
| 12. Parafuchsin | 3000– | 10000+ | 10000+ | · | 10000– | 10000– | · | 30000– |
| 13. Tryparosan | 3000– | · | · | · | · | 10000– | · | 3000– |
| 14. Methylviol. | · | · | · | · | 100000 ± | 100000– | · | · |
| 15. Krystallviol. | · | · | · | · | 10000– | 100000– | · | · |
| 16. Dahlia (Hoffmann-Violett Grübler) | · | 3000– | 3000– | 3000+ | 100000– | 100000– | · | 800000– |
| 17. Neu-Viktoria-grün | 10000– | 10000– | 10000+ | · | 100000– | 50000– | · | · |
| 18. Malachitgrün 1A Höchst | 10000– | 10000– | 10000 ± | · | 100000– | · | · | 100000– |
| 19. Brillantgrün | 100000– | 100000– | 100000 ± | · | 1 Mill. | 1 Mill.– | · | 400000– |
| 20. Trypanrot | · | · | 300+ | · | · | · | · | 300– |
| 21. Trypanblau | · | · | 300+ | · | · | · | · | 300+ |
| 22. Chinolinrot | 10000+ | 1000+ | 1000+ | · | 10000– | 25000– | · | 10000– |
| 23. Chinolingelb wasserlöslich | 1000+ | 1000+ | 1000+ | · | 1000+ | · | · | · |
| 24. Alt-Salvars. | · | 8000– | · | · | · | 10000– | · | · |



*Tabelle I.*

**Rotlaufbacillen, Tetragenus, Diphtheriebacillen, Pneumo- und Streptokokken.**

| i | k | l | m | n | m | o | p | q | r |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Rotlaufbacillen | Tetragenuskokken | Shigabacillen | Milzbrandbacillen | Diphtheriebacillen | Pneumokokken | Streptokokken | Micrococcus melitensis | Choleravibrionen | Hühnercholerabacillen |
| 00000– | 100000– | 100000 bis 300000– | | | 100000 bis 300000– | | | | 2 Mill.– |
| 00000– | · | · | 100000 bis 300000– | | | | 100000– bis 300000– | | |
| 00000– | · | · | 100000– | · | 300000– | 100000– | · | · | 300000– |
| · | 30000– | · | · | · | · | · | · | · | 300000– |
| 00000– | · | · | 100000– | · | 300000– | · | · | · | 300000– |
| · | 10000– (30000+) | 10000+ | 10000– (30000+) | · | · | · | · | · | 100000– |
| · | · | · | · | · | · | · | · | · | 500000– |
| 10000+ | · | 5000– | 100000– | · | 50000– | 10000– | · | 100000± | 10000– |
| 10000+ | · | 10000– | · | · | 100000– | 10000– | · | · | 10000– |
| 10000+ | · | 100000– | · | · | 100000– | 10000– | · | · | 100000– |
| 10000+ | · | 10000+ | 10000– | · | 10000– | 10000+ | · | 30000± | 1000– |
| 10000– | · | · | {100000– (300000+)} | · | 30000– | 100000– | · | 10000– | 30000– |
| · | · | · | {100000– 300000–} | · | 10000– | · | · | · | 10000– |
| 10000+ | · | 100000± | 10 Mill.– | · | 10000– | 10000+ | · | · | 10000– |
| 10000+ | · | 10000– | 10 Mill.– | · | 100000– | 10000+ | · | · | 10000– |
| 0000+ | 3 Mill.– | 10000– | 1 Mill.– (3 Mill.–) | 1 Mill. | 100000± | 50000± | · | 10000– (30000+) | 10000– |
| 0000– | · | 10000– | 100000– | · | 100000– | 100000– | · | 100000– | 10000– |
| · | · | 100000– | 1 Mill.– | · | 10000– | · | · | · | · |
| · | · | 100000– | 10 Mill.– | · | 500000– | 400000– | · | 300000– | 10000– |
| · | · | · | 300+ | · | 10000+ | · | · | · | 300– |
| · | · | · | 300– | · | 10000+ | · | · | · | 300– |
| · | · | 3000 | 300000– | · | 30000– | 50000– | · | 30000– | 10000– |
| · | · | 1000+ | 1000+ | · | 1000+ | 1000+ | · | 1000+ | 100– (300+) |
| · | 30000– | · | 1,6 Mill.– | · | · | · | 300000– | · | · |

In den in Tabelle I zusammengestellten Versuchen wurden die Konzentrationen der Farbstoffe teils 1 : 1000—10 000—100 000, teils 1000—3000—10 000, teils 1000—2500—5000—10 000, teils 1000—2000—4000—8000 usw. abgestuft. Der Übersichtlichkeit halber ist in der Tabelle in den meisten Fällen nur eine Grenzzahl angegeben. Beginnt diese Grenzzahl mit 1, also 1000, 10 000, 100 000 usw., ohne daß eine weitere Zahl in Klammern danebensteht, so handelt es sich um einen Versuch mit grober Abstufung 1 : 10 usw., in den anderen Fällen ist die Art der Abstufung aus den betreffenden Zahlen nach dem soeben Gesagten zu entnehmen.

Die Einsaat betrug in der Regel $^1/_{10}$, oft auch $^1/_{50}$ oder $^1/_{100}$ Tropfen, Die Abtötung in 24 Stunden entsprach bei dieser geringen Einsaat gewöhnlich der Entwicklungshemmung, bei Wahl engerer Grenzen (1 : 2 oder 2,5) lag sie bei Pneumokokken, Streptokokken, Staphylokokken, Coli, Typhusbacillen oft eine Stufe niedriger.

Nach der Tabelle I sind hohe spezifische Wirkungen besonders auffallend bei den Acridinfarbstoffen gegenüber Hühnercholerabacillen Diese Bacillen werden überhaupt nur von den Acridinfarbstoffen in höherem Maße beeinflußt. Dabei ist von den 3 Phosphinen nur Aurophosphin 4 g extra bis 1 : 100 000 wirksam, Aurophosphin g extra und Chrysanilin wirken viel schwächer. Die übrigen Acridinpräparate bleiben mit einer Beeinflusssung zwischen 100—300 000 hinter dem Trypaflavin zurück, während sie Shigabacillen, Milzbrandbacillen, Diphtheriebacillen, Pneumokokken, Streptokokken und Micrococcus melitensis bei gleichzeitiger Prüfung mit Trypaflavin größtenteils ebenso stark beeinflussen. Acridinorange zeigt gegenüber fast allen geprüften Bakterienarten viel geringere entwicklungshemmende Kraft; nur Milzbrandbacillen werden stark, Choleravibrionen und Pneumokokken noch einigermaßen stark beeinflußt. Argoflavin zeigt ebenfalls starke Wirkung auf Hühnercholerabacillen; es ist sonst nur wenig untersucht worden.

Für die besondere Wirkung des Trypaflavins auf Hühnercholera ist wohl die Methylierung im N-Atom des Pyridinkerns verantwortlich zu machen.

Die Wirkung der Acridinpräparate auf y-Ruhr ist weit geringer als auf Shigabacillen, während sich Brillantgrün umgekehrt verhält und Malachitgrün beide Ruhrarten gleich beeinflußt. Abgesehen von den Shigabacillen erweist sich allen anderen sowohl grampositiven wie gramnegativen Bakterien gegenüber Brillantgrün, die äthylierte, dem Malachitgrün, der methylierten Substanz überlegen, auch in der Wirkung auf Milzbrandbacillen, bei denen beide ihren Gipfelpunkt erreichen. In allen diesen Fällen wurden beide Präparate gleichzeitig geprüft. Noch einige andere Präparate zeigten die größte Giftigkeit gegenüber



Milzbrandbacillen, vor allem Methylviolett und Krystallviolett, die gleich hoch (bis 1 : 10 Millionen) wirksam waren. Alle anderen mit diesen beiden Substanzen geprüften Bakterien waren widerstandsfähiger. Die grampositiven Rotlaufbacillen wurden sogar bei 1 : 10 000 nicht gehemmt. Nur gegenüber Influenzabacillen, für Krystallviolett auch gegenüber Pneumokokken, wurde noch eine Wirksamkeit bis 1 : 100 000 nachgewiesen. Es sei aber bemerkt, daß diese letzteren Angaben sich nur auf wenige Versuche stützen und daher vielleicht nicht ganz zuverlässig sind. Ebenso ist der Wert 1 : 10 000 — d. h. 100 000+ gegenüber Shigabacillen für Krystallviolett auf Grund weniger Versuche angegeben. Hier wurden Brillantgrün, Methylviolett, Krystallviolett und Chrysanilin in zwei Versuchen gleichzeitig geprüft, in dem einen Versuch war die Grenze 100 000 — für die 3 ersten Präparate, in den anderen aber ergab nur Methylviolett 1: 100 000 ±, Krystallviolett aber 10 000 —, 100 000+. Ebenso verhielt sich übrigens Brillantgrün. Wir möchten annehmen, daß die Widerstandsfähigkeit der Bakterien eine schwankende ist. Dem entsprechen auch die Erfahrungen bei der Stuhluntersuchung. Wir selbst sahen, ebenso wie andere Untersucher, daß Shigabacillen auf *Drigalski-Conradi*-Agar mit Krystallviolett 1 : 100 000 öfters gut wachsen, während das Wachstum vieler Kulturen völlig gehemmt wird.

In betreff der Streptokokken sei mit Rücksicht auf die schlechte Wirkung des Krystallviolett hervorgehoben, daß Dahlia und Krystallviolett nicht gleichzeitig geprüft worden sind. Auch Parafuchsin wurde nur gleichzeitig mit Dahlia, nicht mit Krystallviolett geprüft. Dagegen wurde das (nicht alkylierte) Parafuchsin gleichzeitig mit den beiden alkylierten Verbindungen Krystallviolett und Methylviolett gegenüber Milzbrandbacillen geprüft; es bleibt weit hinter den beiden violetten Farbstoffen zurück, beeinflußt aber ebenfalls die Milzbrandbacillen höher als die meisten anderen Bakterien. Wie Parafuchsin verhielt sich Tryparosan.

Auch Dahlia zeigt sehr hohe Wirksamkeit gegenüber Milzbrandbacillen, besitzt aber noch 3 Gipfelpunkte: gegenüber Staphylokokken, Tetragenus und Diphtheriebacillen. Besonders bemerkenswert ist, daß dieser Farbstoff Streptokokken und Pneumokokken sehr wenig beeinflußt. Daß sich dieses elektive Verhalten für einen differentialdiagnostischen Nährboden verwerten läßt, wurde bereits von *Baumgarten* (Berliner mikrobiol. Ges. 11. 4. 21) mitgeteilt. Auf Agarplatten mit Dahliazusatz 1 : 100 000 zeigten eine Anzahl von Strepto- und Pneumokokkenstämmen Wachstum, in der Regel sogar gutes Wachstum, während Staphylokokken auch bei 1 : 400 000 und 1 : 800 000 selbst bei starker Aussaat nicht oder nur ganz spärlich fortkamen. Sollten in der Praxis Versager vorkommen, so kann man ohne Schaden





für die Elektivität bis auf 1 : 800 000 Dahliagehalt heruntergehen, nur würde dann die blaue Farbe des Nährbodens verschwinden, die uns insofern von Vorteil erschien, als Pneumokokken (übrigens auch Streptococcus viridans) sich durch Reduktion des Farbstoffes von hämolytischen (und einem nicht hämolytischen) Streptokokkus unterscheiden ließen. Wir geben hier einen Versuch wieder, der in Serumbouillon mit einer Mischkultur von Staphylokokken und Streptokokken angestellt wurde und die spezifische Wirkung deutlich macht.

*Tabelle II.*

Prüfung der abtötenden Wirkung von Dahliaserumbouillon auf ein Streptokokken-Staphylokokkengemisch durch Aussaat von 1 Öse auf Blutagarplatten nach 24 stündiger Einwirkung. Volumen 2 ccm. Einsaat 1 Tropfen Bouillonkultur.

| Einsaat 1/10 Tropfen von | Wachstum auf Blutagar von: | 1 : 50 000 | 1 : 100 000 | 1 : 200 000 | 1 : 400 000 | 1 : 800 000 | 1 : 1 000 000 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| a) Mischkultur von Streptok. Scharlach und Staph. aureus | Streptokokken | ± | + | + | + | ganz spärl. überwuchert von Staphyl. | nicht nachweisbar |
| | Staphylokokken | O | O | ganz vereinzelt | | + | + |
| b) Mischkultur von Streptok. Maus und Staphyl. aureus | Streptokokk. | + | + | + | + | + | über-wuchert |
| | Staphylokokken | O | O | O | O | + | + |

Wie die zuletzt besprochenen Farbstoffe weisen auch Salvarsan, Chinolinrot und von den Acridinfarbstoffen Acridinorange einen Gipfelpunkt bei Milzbrandbacillen auf. Von Salvarsan ist es ja bekannt, daß seine höchste Wirksamkeit gegenüber Milzbrandbacillen zutage tritt, Rotlaufbacillen werden zwar in der Entwicklung fast ebenso hoch beeinflußt, aber nicht in der Abtötung. Wie die Tabelle 1 zeigt, ist Salvarsan, das gleichzeitig mit Trypaflavin geprüft wurde, diesem in der Wirkung auf Milzbrandbacillen überlegen, während beide auf *Micrococcus melitensis* gleich stark wirken. Chinolinrot zeigt nach der Tabelle nur gegenüber Milzbrandbacillen einen Gipfelpunkt. Diese Substanz hat sich aber in Fällen, wo sie mehrfach geprüft wurde, von sehr wechselndem Verhalten gezeigt. *So wurden Staphylokokken einmal nur bis 1 : 10 000, ein anderes Mal bis 1 : 3 Millionen, Hühnercholerabacillen 2 mal bis 1 : 10 000, 1 mal bis 3 Millionen, Milzbrandbacillen 1 mal bis 1 : 300 000 und 1 mal bis 5 Millionen in ihrer Entwicklung gehemmt.*

Bemerkenswert erscheint, daß für keine einzige Substanz sich die Regel aufstellen läßt, daß durchweg die grampositiven Keime besser beeinflußt werden, als die gramnegativen, wenn auch für Brillant-

grün, Krystallviolett, Methylviolett und Dahlia der Gipfelpunkt hierhin fällt. Auch *Browning* und *Gilmour* äußern sich dahin, daß man nur behaupten könne, daß die Typhus-Coligruppe durch Triphenylmethanfarbstoffe schwächer beeinflußt werde, als grampositive Keime.

Trypanrot, Trypanblau und Chinolingelb wirken allen geprüften Erregern gegenüber im Reagensglasversuch sehr schwach.

Während alle diese Prüfungen den im Körper vorliegenden Bedingungen entsprechend bei 37° vorgenommen wurden, wurde die Versuchsanordnung bei den *Pestbacillen* etwas modifiziert. Die Bacillen, die ihr Wachstumsoptimum niedriger, etwa bei 33° haben, mußten erst an 37° gewöhnt werden. Alsdann wurden die Versuchsröhrchen zunächst bei 37° 24 Stunden lang gehalten. Darauf wurde mikroskopiert und nun noch 48 Stunden bei 33° beobachtet, wieder mikroskopiert und zur Kontrolle auf Agar geimpft.

Dabei ließ sich zuweilen in Konzentrationen, in denen gutes Wachstum eingetreten war, eine deutliche Färbung der Bacillen beobachten; so sahen wir nach 72 Stunden (davon 48 Stunden 33°) in Acridinorange reichliches Wachstum bei 1 : 10 000 Verdünnung mit Bouillon, aber nur in gefärbten Häufchen. Auf Abimpfung 1 Öse erfolgte aus Acridinorange 1 : 10 000, Trypaflavin und Nitrat 1 : 20 000, Base 1 : 40 000 reichliches Wachstum typischer Pestkolonien. Auch sonst haben wir gelegentlich (bei Friedländerbacillen) in starken Trypaflavinkonzentrationen reichliches Wachstum gefärbter Bacillen gesehen.

Gegen die Annahme einer Vitalfärbung bei derartigen Versuchen wendet *Eisenberg* ein, daß in 24 stündigen Kulturen bereits eine große Anzahl abgestorbener Bakterien vorhanden sei. Er fordert zu Vitalfärbungsversuchen Untersuchung 6—10 stündiger Kulturen und ist geneigt, anzunehmen, daß es eine Vitalfärbung im eigentlichen Sinne nicht gibt. *Reichert*, der mit einer besonderen Versuchsanordnung in Deckglaskulturen auf Agar mit Viktoriablau gefärbte (sporenhaltige) Milzbrandfäden auskeimen sah, fand, daß die jungen Keime sich nicht weiter vermehrten. Nach *Eisenberg* hatten *Pfeiffer* ebenso wie *Nikanishi* mit Methylenblau gefärbte bewegliche Choleravibrionen gesehen; auch *Churchmann* sah mit Gentianaviolett gefärbte und bewegliche Gärtnerbacillen. Indessen nehmen *Reichert* und *Eisenberg* an, daß eine solche Vitalfärbung stets in kurzer Zeit zum Tode führt. Zwar gelang es *Reichert*, an 15 stündigen Typhuskulturen durch Zusatz von 1/3 Volum 0,2 proz. Malachitgrünlösung zu 1 ccm Bakterienaufschwemmung momentane Anfärbung sämtlicher Bacillen zu erzielen und eine Fortdauer des Lebens bis zu 5′, wie in der Kontrolle nachzuweisen, wenn er die Bacillen mit Tierkohle entfärbte; wurden sie aber erst nach 10 oder 20′ entfärbt, so überlebte nur noch ein Bruchteil. Andererseits könnte man unter Zugrundelegung der Annahme von *Shiga*, daß z. B. Choleravibrionen schon in Stunden eine Arzneifestigkeit gegenüber Trypaflavin erwerben, unsere Beobachtungen von gefärbten Pest- und Friedländerbacillen, die noch reichlich bei Aussaat angingen, durch Arzneifestigkeit dieser Bakterien zu erklären.

In anderen Fällen sahen wir Färbung und Abtötung parallel gehen, so in einem Versuch mit Shigabacillen und Trypaflavin. Eine Shiga-



**bouillonkultur wird mit fallenden Trypaflavinverdünnungen (0,25 ccm Bouillon + 0,25 ccm Trypaflavinlösung in Kochsalzlösung) versetzt. Der Versuch wird in kurzen (Phagocytose-)Röhrchen bei 37° angestellt (Brutschrank). Nach 1, 20 und 48 Stunden wird mikroskopiert und abgeimpft. Das Fortschreiten der Färbung ist aus Tabelle 3 ersichtlich.**

*Tabelle III.*

Färbungszeit von Shigabacillen durch Trypaflavinverdünnungen. 0,25 ccm Bouillonkultur + 0,25 ccm Trypaflavinverdünnung von doppelter Konzentration als in der Tabelle angegeben. Beobachtung im hängenden Tropfen. O = ungefärbt.

| Färbung | 1 : 10 000 | 1 : 20 000 | 1 : 40 000 | 1 : 80 000 | 1 : 160 000 | 1 : 320 000 | 1 : 640 000 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nach 1 Std. | leicht gelb gefärbt | nur angedeutet | O | O | O | O | O |
| „ 20 „ | deutl. gelb, Pole stärker | deutliche Gelbfärbg. | deutliche Färbung | schwäch. Färbung, nicht alle Bacillen gefärbt | einzelne mit deutl. gelben Pol. Meist O | O | O |
| „ 48 „ | deutliche Gelbfärbung | | | | | schwäch. Färbung | O |

**Entsprechend der Färbung erfolgte Wachstum bei Abimpfung eines Tropfens auf Schrägagarröhrchen nach 1 Stunde bei 1 : 20 000, nach 20 Stunden bei 1 : 160 000, nach 48 Stunden erst bei 1 : 320 000.**

Analog angestellte Versuche mit frisch gewonnenen Meerschweinchenleukocyten ergaben sofortige diffuse Gelbfärbung noch bei 1 : 20 000, bei 1 : 40 000 bis 1 : 160 000 sah man nur einen leichten gelben Schimmer, deutliche Färbung erfolgte bei 1 : 40 000 erst nach 30′ (nicht nach 15′), bei 1 : 80 000 bis 1 : 160 000 waren nur mehr oder weniger Granula gefärbt, während bei 1 : 40 000 die Zellen deutlich gelb und zum Teil auch Granula und Kern gefärbt waren. Die Kernfärbung wurde erst nach 60′ bei 1 : 40 000 deutlich. Nach 2 Stunden ergab sich kein Fortschritt. Nach 20 Stunden waren Protoplasma, Granula und Kerne in 1 : 80 000 deutlich gefärbt, in 1 : 160 000 war das Protoplasma kaum, Granula und Kern deutlich gefärbt, während 1 : 320 000 nur deutlich gefärbte Granula zeigte. Bei 1 : 640 000 waren nur nach 20 Stunden Spuren von Färbung an Protoplasma und vereinzelte Granula zu sehen. Den Versuch mit Leukocyten und Shigabacillen verdanken wir der Mitarbeit von *Reinhardt*. Man könnte aus ihm auf eine ungünstige Verteilung des Trypaflavin zwischen Körperzellen und Bakterien schließen, doch besteht die Möglichkeit der Transgression.

Ähnliches wie an Shigabacillen wurde an Pneumokokken gelegentlich eines Entwicklungshemmungsversuches beobachtet.

Mit einer Placentabouillon, die von Natur alkalisch und geeignet für Pneumokokken war, wurden fallende Trypaflavinverdünnungen hergestellt. Volumen 4 ccm. Einsaat 1 Tropfen Bouillonkultur. Nach 24 Stunden fand sich bei 1 : 500 000, 600 000, 700 000 im hängenden



Tropfen nur eine geringe Zahl von Bakterien, wohl nur die Einsaat. Bei 1 : 500 000 waren nur polgefärbte stäbchenähnliche Gebilde vorhanden, die an Hühnercholerabacillen erinnerten; 1 : 600 000 und 700 000 zeigten daneben auch normale farblose Pneumokokken. Nach 48 Stunden zeigte 1 : 500 000 dasselbe Bild, die beiden anderen Röhrchen waren dicht mit typischen Pneumokokken bewachsen. Auch die Abimpfung — nach 24 Stunden — auf Blutagar ergab ein entsprechendes Resultat. In diesem Fall fielen also Färbung und Abtötung zusammen.

Eine große Zahl von Versuchen wurde an Pneumokokken vergleichend mit Optochin und Trypaflavin ausgeführt. Es ergab sich meist eine etwas stärkere Beeinflussung durch Optochin. Bei Kombination beider Mittel konnte in mehreren Versuchen, wie aus den am Schluß der ersten Arbeit von *Neufeld* und *Schiemann* mitgeteilten — in Tabelle IV nochmals wiedergegebenen — Zahlen hervorgeht, eine erhebliche Steigerung der Wirkung beobachtet werden. Jedoch als die Versuche mit einem anderen Stamm ausgeführt wurden, waren die Resultate sehr unregelmäßig. Ein Beispiel gibt Tabelle IV.

*Tabelle IV.*

Vergleichende Prüfung der entwicklungshemmenden Wirkung von Optochin, Trypaflavin und der Kombination beider auf Pneumokokken. Volumen 2 ccm. In den Röhrchen mit beiden Desinfizientien findet sich je 1 ccm der doppelten Konzentration jedes Mittels als angegeben.

| | | Trypaflavin | Optochin | Beides kombiniert |
|---|---|---|---|---|
| 1 $^1/_{10}$ Tr. | Pn. Jaeger | 400 000 —<br>600 000 + | 200 000 + | 600000 Tryp. + 1 Mill. Opt.<br>: kein Wachstum |
| 2 $^1/_{10}$ „ | dgl. | 300 000 —<br>400 000 + | 200 000 —<br>500 000 + | 800000 Tryp. + 1 Mill. Opt.<br>: kein Wachstum |
| 3 $^1/_{100}$ „ | Pn. Lentz | 400 000 —<br>800 000 + | 2 Mill. —<br>4 Mill. + | 800000 Tryp. + 4 Mill. Opt.<br>: Wachstum + |
| 4 $^1/_{10}$ „ | Pn. Jaeger | 200 000 +<br>400 000 + | 400 000 ±<br>800 000 ∓ | 200000 Tryp. + 800000 Opt.<br>: kein Wachstum |

Ferner interessierte das Verhalten des Trypaflavins gegenüber avirulenten Pneumokokken. Trypaflavin verhielt sich gegen avirulente Pneumokokken (und ebenso gegen virulente Streptokokken) grundsätzlich anders wie Optochin. Entsprechend der hohen Wirksamkeit des Trypaflavins auch auf Streptokokken, von denen avirulent gewordene Pneumokokken infolge der mangelnden Auflösungsfähigkeit in Galle und ihrer Resistenz gegen Optochin nicht zu unterscheiden sind, wirkt es auf avirulente Pneumokokken ebenso gut wie auf virulente. In Tabelle V und VI sind zwei Versuche aufgeführt. Pneum. Wa. virulent ist ein hochvirulenter Stamm, der auch mit $^1/_1$ Milliardstel ccm



Bouillon Mäuse in 2 Tagen tötete. Pneum. Wa. avirulent ließ sich im Beginn der Tierpassagen aus diesem Stamm abspalten und zeigte den Typus eines avirulenten Pneumokokkus. Pneum. Jäger war, als er in Tabelle IV geprüft wurde, noch virulent, degenerierte aber nach längerer Fortzüchtung auf Blutagar allmählich; wie in einer späteren Arbeit näher mitgeteilt werden soll, geht dabei der Verlust der Virulenz und der Empfindlichkeit gegen Galle (und Optochin) nicht immer genau parallel, so daß man zuweilen Stämme findet, die Mäuse in sehr kleinen Dosen töten, sich aber nicht mehr in Galle lösen.

Die übrigen Stämme waren virulent. Wir sehen in Tabelle V und VI eine annähernd gleichmäßige Beeinflussung durch Trypaflavin.

*Tabelle V.*

**Entwicklungshemmung von avirulenten Pneumokokken durch Trypaflavin in Serumbouillon.**

| Name des Stammes | In Optochin und Galle | Frühere Behandlung | Zum Versuch 1 Tropfen aus | 1:100 000 | 1:800 000 | 1:1 Million |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pn. Jäger | unbeeinflußt | auf Blutagar fortgezüchtet | vor 24 Stund. angelegter Serumbouill. | O | ± | + |
| Pn. Wa. avirulent[1] | dgl. | in Milch „ | Milchröhrchen | O | ± | + |
| dgl.[2] | dgl. | a. Blutagar „ | Serumbouillon | O | ± | + |

*Tabelle VI.*

**Entwicklungshemmung von avirulenten und virulenten Pneumokokken durch Trypaflavin und Optochin. Volumen 2 ccm Serumbouillon. Einsaat 1 Tropfen Aufschwemmung. 1 Öse Blutagarkultur in 2 ccm Bouillon.**

| | Pn. 8 | Pn. avirulent Jaeger | Pn. Wa. avirulent | Pn. Wa. avirulent | Pn. Jugarsch | Pn. Lermer |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Optochin | . | 10 000 + | 10 000 + | 1 Mill. − | 500 000 − | 250 000 ± |
| Trypaflavin | 100 000 − | 100 000 − | 50 000 ± | 100 000 − | 50 000 − | 100 000 − |

## *V. Versuche über die Schnelligkeit der Abtötung.*

Mit Rücksicht auf die Ansicht mancher Autoren, daß für eine chemotherapeutische Wirkung nur die Abtötung in kurzer Zeit in Betracht käme und auf *Shigas* Erfahrung, daß Abtötungsversuche mit Choleravibrionen in den ersten 3 Stunden auch bei Trypaflavin regelmäßig ausfallen, wurden auch Abtötungsversuche angestellt. Wir wollten dabei auch prüfen, ob ähnlich wie beim Salvarsan die Abtötungsgeschwindigkeit wesentlich hinter der der gewöhnlichen Desinfizientien zurückbleibt. Die meisten Versuche wurden mit Choleravibrionen vorgenommen; bei chemotherapeutischen Versuchen mit



Cholera ist ja auch im Tierkörper eine schnelle Abtötung, wenigstens der Hauptmenge der Vibrionen, notwendig.

*Shiga* hat seine Abtötungsversuche in Kochsalzlösung angestellt, die (4 ccm) mit 0,25 ccm Cholerabouillon beimpft wurde. Unsere in Tabelle VII dargestellten Versuche beziehen sich auf Bouillon und (in Versuch Nr. 7) Peptonwasser und wurden bei 37° im Wasserbade gemacht. Später werden noch einige Versuche, die im Brutschrank angestellt waren, und bei denen verschiedene Nährböden, sowie Serum und Blut verschiedener Tierarten verglichen werden, wiedergegeben Es scheint, als ob durch die raschere und vor allem gleichmäßigere Erwärmung im Wasserbade die Abtötung außerordentlich beschleunigt wird.

Gleich der erste Versuch mit Hühnercholerabacillen ist gegenüber den im Brutschrank angestellten durch eine viel schnellere Abtötung ausgezeichnet. Während im Brutschrank (vgl. Tabelle XX und XXI) nach 30 Minuten noch in den Verdünnungen 1 : 50 000 bis 1 : 100 000, wenn auch spärlich Keime nachweisbar waren, sind hier bereits bei 1 : 300 000 alle Keime abgetötet. Auch der Milzbrandversuch mit Salvarsan (Tab. VII Nr. 19) erscheint gegenüber den Versuchen von *Schiemann* und *Ischiwara*, die im Brutschrank angestellt waren, günstiger. Hier sei eingefügt, das Milzbrand*sporen* durch Trypaflavin auch in 24 Stunden nicht stärker als in Konzentrationen 1 : 1000 und 1 : 3000 abgetötet werden, 1 : 10 000 ließ sie unbeeinflußt.

Gegenüber Tetragenus (Versuch 20—22) erwiesen sich Trypaflavin, Diaminoacridinchlorid, Salvarsan und Optochin als schwach wirksame Desinfizientien.

Mit Choleravibrionen, die durch alle Antiseptica relativ schnell abgetötet werden, erhielten wir, sowohl was die Schnelligkeit, wie die Größe der abtötenden Kraft betrifft, nicht ganz übereinstimmende Werte. Der Vergleich mit Sublimat zeigt gleichen zeitlichen Ablauf bei beiden Desinfizientien, wenigstens in den Versuchen 7 und 8, die am gleichen Tage gegenüber der gleichen Einsaat angestellt wurden. Andererseits ergibt Versuch 9 eine starke Steigerung der Desinfektionswirkung des Trypaflavins in der Zeit swischen 30 Minuten und 24 Stunden. In Versuch 2 und 3 sowie in zahlreichen Entwicklungshemmungsversuchen, erwies sich der Cholerastamm 8 resistenter als 79. Die Versuche 9—12 und 13—16, die je an einem Tage angestellt wurden, deuten aber auch auf stärkere Schwankungen in dem Verhalten ein und desselben *Stammes* hin. Es wurde beidemal eine Mischung von einer frisch durch eine Maus passierten und einer alten Laboratoriumskultur verwendet. Wahrscheinlich hat letztere in den Versuchen 13 bis 16 den Ausschlag gegeben, denn wir fanden alte, eine Zeitlang unregelmäßig überimpfte Kulturen oft von größerer Resistenz. Solche ältere Kulturen mit Individuen von langsamerer Wachstumsintensität



*Tabelle VII.* Abtötungsversuche
Die Mittel wurden in Wasser gelöst, zu jeder einzelnen Verdünnung in 10fach
1 oder 2 Tropfen einer Aufschwemmung einer 24 stündigen Agarkultur in Bouillon.
Brutschrank. Aussaat: in den angegebenen

| | | 3′ | 5′ | 10′ |
|---|---|---|---|---|
| 1. Hühnerchol.-Bacillen . | Trypaflavin in Bouillon . . . | · | 10000 – | · |
| 2. Choleravibr. Stamm 8 | „ in stark alk. Bouillon | · | 10000 – | · |
| 3. „ „ 79 | „ „ „ „ „ | · | 10000 – | · |
| 4. „ „ 79 | „ „ „ Peptonwasser | · | 10000 – | · |
| 5. „ „ 79 | Sublimat in stark alk. Bouillon | · | 10000 – | · |
| 6. „ „ 3 | „ „ „ „ „ | · | 10000 – | · |
| 7. „ „ 3 | „ „ „ „ „ | · | 10000 – | · |
| 8. „ „ 3 | Trypaflavin „ „ „ | · | 10000 – | · |
| 9. Gemisch von Ausgangsstamm u. Stamm aus Tierpassage v. Chol. 3 | „ „ „ „ | · | 30000 – | · |
| 10. „ | Acridinnitrat „ „ „ | · | 10000 – | · |
| 11. „ | Brillantgrün „ „ „ | · | 3000 – | · |
| 12. „ | Chinolinrot „ „ „ | · | 3000 – | · |
| 13. Dies. Misch. w. b. 9—12 | Trypaflavin „ „ „ | · | 3000 – | · |
| 14. „ „ „ „ 9—12 | Acridinnitrat „ „ „ | · | 3000 – | · |
| 15. „ „ „ „ 9—12 | Brillantgrün „ „ „ | · | 3000 – | · |
| 16. „ „ „ „ 9—12 | Chinolinrot „ „ „ | · | 10000 – | · |
| 17. Milzbrandbacillen . . . | Trypaflavin in Bouillon . . . | 3000 + | · | [illegible] |
| 18. „ . . . | Salvarsan „ „ . . . | 10000 – | · | 1000 |
| 19. Tetragenuskokken . . | Trypaflavin „ „ . . . | · | 3000 + | · |
| 20. „ . . . | Acridinchlorid „ . . . | · | 1000 + | · |
| 21. „ . . . | Salvarsan „ „ . . . | · | 3000 – | · |
| 22. „ . . . | Optochin „ „ . . . | · | 1000 + | · |

fand *Reichenbach* auch gegenüber physikalischen Desinfektionsmitteln resistenter.

Im ganzen ist die abtötende Kraft des Trypaflavins gegenüber Choleravibrionen wohl stark und schnell genug, um unsere Ansicht zu stützen, daß die Heilwirkung in unseren Tierversuchen, wo eine Menge von 0,2 ccm 1 : 800 in die Bauchhöhle einer Maus von 20 g gebracht wurde, auf Abtötung beruht.

### *VI. Über die Ursachen der Schwankungen im Ausfall der Vitroversuche. Versuche mit verschiedenen Stämmen und in verschiedenen Nährböden.*

Diese Versuche wurden zur Aufklärung der Schwankungen und insbesondere der verstärkten Wirkung des Trypaflavins in Serum unternommen. Da auch in Versuchen von *Schiemann* und *Ishiwara* an Rotlauf- und Milzbrandbacillen mit Salvarsan eine Verstärkung der Wirkung dieses Mittels, allerdings nur in aktivem Serum aufgefallen war, so wurde Salvarsan in einigen Versuchen vergleichend herangezogen.

Schon bei den Abtötungsversuchen mit Cholera wurde darauf hingewiesen, daß die Stämme sich verschieden verhalten, Stamm 8 be-



**im Wasserbade bei 37°.**
**stärkerer Konzentration, als angegeben, zugesetzt. Volumen 2 ccm. Einsaat**
**Die Röhrchen bleiben 30′ bis 2 Stunden im Wasserbad, kommen dann in den Zeiten je 1 Tropfen auf ein Schrägagarröhrchen.**

| 15′ | 30′ | 1h | 2h | 24h | Einsaat |
|---|---|---|---|---|---|
| 300000– | 300000– | · | · | 1000000– | 1 Tropf. Agarabschwemm. in 3 ccm |
| 30000– | 30000– | · | · | 30000– | 1 „ „ „ 3 „ |
| 30000– | 30000– | · | · | 100000– | 2 „ „ „ 2 „ |
| 10000– | 10000– | · | 30000– | dgl. | 2 „ „ „ 2 „ |
| 30000– | 30000– | · | 100000± | „ | 2 „ „ „ 2 „ |
| 30000± | 30000– | · | 30000– | „ | 2 „ „ „ 2 „ |
| 10000– | 10000– | · | · | 30000– | 2 „ „ „ 2 „ |
| 30000± | 30000± | · | · | dgl. | 2 „ „ „ 2 „ |
| 30000– | 30000– | 100000– | · | 1000000– | 1 „ „ „ 1 „ |
| 30000– | 30000– | 100000– | · | 300000– | 1 „ „ „ 1 „ |
| 3000– | 10000– | 10000– | · | 100000– (1 Mill.±) | 1 „ „ „ 1 „ |
| 3000– | 10000– | 10000– | · | dgl. | 1 „ „ „ 1 „ |
| 10000– | 10000– | · | · | 30000– | 1 „ „ „ 1 „ |
| 10000± | 10000– | · | · | dgl. | 1 „ „ „ 1 „ |
| 10000± | 10000+ | · | · | „ | 1 „ „ „ 1 „ |
| 10000– | 10000– | · | · | „ | 1 „ „ „ 1 „ |
| · | 30000– | · | · | · | 1 „ „ „ 4 „ |
| · | 1000000± | · | · | · | 1 „ „ „ 4 „ |
| · | 3000– | · | · | 30000– | 1 „ „ „ 2 „ |
| · | 3000± | · | · | 30000± | 1 „ „ „ 2 „ |
| · | 1000± | · | · | 10000– | 1 „ „ „ 2 „ |
| · | 1000+ | · | · | 3000± | 1 „ „ „ 2 „ |

sonders resistent, Stamm 79 besonders empfindlich war, Stamm 3 sich ungleich verhielt. Das geht auch aus folgenden Entwicklungshemmungsversuchen mit Diaminoacridinnitrat hervor.

Tabelle VIII zeigt ziemlich beträchtliche Unterschiede in den Ergebnissen, insofern als die Stämme 8, Aleppo, 70 und 5688, schlechter als Cholera 79 beeinflußt werden. Zwischen den drei Varietäten von Cholera 3 sind die Unterschiede nicht groß. Aus der geringen Differenz läßt sich eine Festigung des Stammes, der aus dem erfolglos behandelten Tier stammt, nicht herleiten. Daß *spontan* sehr viel stärkere Schwankungen gelegentlich vorkommen, zeigt die oben (S. 252) erwähnte Beobachtung, wonach die (allerdings nicht im gleichen Nährboden festgestellte) Wachstumsgrenze eines Cholerastammes in Trypaflavin nach monatelanger Fortzüchtung von 300 000— bis auf 10 000+ herabsank.

Tabelle IX zeigt eine deutlich schwächere Beeinflussung des Stammes 8, besonders bei Vergleich mit der von Cholera 79 durch Acridinorange.

Aus diesen Versuchen ist zu entnehmen, daß verschiedene Stämme derselben Bakterienart sich der gleichen Lösung gegenüber verschieden verhalten, aus den Abtötungsversuchen war andererseits zu folgern,





*Tabelle VIII.*

*Entwicklungshemmungsversuch mit Diaminoacridin-Nitrat auf verschiedene Cholerastämme.*

**3 Varietäten von Cholera 3: eine frisch durch ein Tier passierte Kultur, eine ebensolche, die jedoch aus einem ohne Erfolg behandelten Tier isoliert war, und eine monatelang ohne Tierpassage fortgezüchtete Kultur (Cholera 3 Passage, Cholera 3 fest? und Cholera 3 Ausgangskultur). Volumen 2 ccm stark alkalische Pferdefleischbouillon, Einsaat $^1/_{10}$ Tropfen Agarabschwemmung: 1 Röhrchen in 2 ccm Bouillon.**

| Name des Stammes | Entwicklungshemmung |
|---|---|
| Cholera 79 . . . . . . . . . . | 500 000 – |
| „ 3 Passage . . . . . . | 250 000 – 500 000 ± |
| „ 3 Ausgangskultur . . | 250 000 – |
| „ Baku. . . . . . . . | 250 000 – |
| „ 1021 . . . . . . . . . | 250 000 — |
| „ 980 . . . . . . . . . . | 250 000 – |
| „ 3 fest? . . . . . . . | 100 000—250 000 + |
| „ 73 . . . . . . . . . . | 100 000—250 000 ± |
| „ 351 . . . . . . . . . . | 100 000 – |
| „ 8 . . . . . . . . . . | 100 000 – |
| „ Aleppo . . . . . . . | 100 000 – |
| „ 70 . . . . . . . . . . | 100 000 – |
| „ 5688 . . . . . . . . . | 100 000 – |

*Tabelle IX.*

**Entwicklungshemmung von 4 verschiedenen Cholerastämmen durch Acridinorange. Volumen 2 ccm. Stark alkalische Bouillon. Einsaat 1 Tropfen einer Aufschwemmung einer Öse Agarkultur in 2 ccm Bouillon.**

| Stamm | Acridinorange |
|---|---|
| Cholera 3 . . . . . . . . . . | 50 000 – |
| „ 79 . . . . . . . . . . | 100 000—250 000 ± |
| „ 980 . . . . . . . . . . | 50 000 – |
| „ 8 . . . . . . . . . . . | 10 000 – |

daß dieselben Stämme, zu verschiedenen Zeiten geprüft, sich verschieden empfindlich zeigen. Wir haben nun zu untersuchen, inwieweit die Beschaffenheit des Nährbodens für die Schwankungen verantwortlich gemacht werden kann.

Zunächst wurde der Einfluß der Alkalität des Nährbodens wiederum bei Choleravibrionen geprüft. Zu diesen Versuchen wurde nicht Pferdefleischbouillon, sondern Placentabouillon verwendet, die in folgender Weise hergestellt wird.

Eine Placenta wird von den Eihäuten und großen Gefäßen befreit, durch den Wolf gelassen, dann mit 1—1$^1/_2$ l Wasser übergossen. Nach 24stündigem Stehen im Eisschrank wird der Abguß filtriert, $^1/_2$ Stunde im Dampftopf gekocht und filtriert und dann mit 1% Pepton und 0,5% NaCl versetzt, nochmals $^1/_2$—1 Stunde gekocht, filtriert und in der üblichen Weise sterilisiert. Die Alkalität braucht



für Typhus- und ähnliche Bakterien, auch für Hühnercholerabacillen nicht korrigiert zu werden, sie beträgt meist 0,4—0,5% Normallauge gegen Lackmus. Für Pneumokokken mußte sie meist erhöht werden (auf 0,8% Normalkalilauge). In unserem Falle war sie so hoch, daß Pneumokokken ausgezeichnet ohne Serumzusatz darin wuchsen. Es waren 4 l hergestellt worden (= naturalkalische Placentabouillon, in Tabelle XI als Bouillon bezeichnet). Zu 2 l wurden 80 ccm Normalnatronlauge gegeben. Die Bouillon blieb, auch nach dem Kochen, klar (Bouillon A in Tabelle X) Zu 1 l der Bouillon A wurden dann 23 ccm Normalsalzsäure gegeben, auch diese Bouillon blieb nach dem Kochen klar (Bouillon B in Tabelle X). Zu $^1/_2$ l der Bouillon A wurden ebenfalls 23 ccm Normalsalzsäure zugefügt. Diese Bouillon wurde trübe, die Trübung blieb nach Kochen und Filtrieren bestehen. Es wurde nun im Reagensglas zu einer Probe so viel Säure zugesetzt, bis das Eiweiß ausfiel, dann die entsprechende Menge zu der ganzen Portion getan. Als jedoch die Ausfällung des Eiweißes vonstatten gegangen und die Bouillon klar filtriert war, erwies sie sich trotzdem nicht als neutral, sondern bläute noch stark das Lackmuspapier (Probe C).

Ein in den Proben A—C angesetzter Entwicklungshemmungsversuch ergab nun eine wesentliche Verstärkung der Trypaflavinwirkung durch Alkali.

*Tabelle X.*

***Einfluß des Alkaligehaltes des Nährbodens auf die Trypaflavinwirkung.***

Entwicklungshemmungsversuch in stark alkalisierter (Bouillon A), mit HCl zum Teil wieder abgestumpfter (Bouillon B) und mit HCl bis zur Enteiweißung, aber nicht bis zum Neutralitätspunkt versetzter (Bouillon C) Placentabouillon. Volumen 2 ccm. Einsaat $^1/_{100}$ Tropfen Bouillonkultur; *in allen 3 Bouillonproben wächst noch $^1/_1$ Millionstel Tropfen Choleravibrionen.*

| Bouillon A | Bouillon B | Bouillon C |
|---|---|---|
| 1,6 Mill. — | 800 000 — | 100 000— 200 000 ± |

Es war die Wirkung bei dem höchsten Alkaligehalt 8—16 mal stärker als in der nicht vollkommen neutralisierten (und enteiweißten) Bouillon. Dabei ließen alle 3 Bouillonsorten Choleravibrionen noch bei einer Einsaat bis zu $^1/_1$ Millionstel Tropfen Bouillonkultur auskeimen, also bei einer 10 000 mal kleineren Einsaat als sie im Versuch benutzt wurde.

Ein ähnliches Ergebnis wie in Tabelle X hatte die Prüfung einer anderen Placentabouillon, der verschiedene Mengen Alkali zugesetzt waren.

*Tabelle XI.*

Vergleichender Versuch mit Trypaflavin und Brillantgrün in verschieden stark alkalischen Nährböden. Entwicklungshemmung von Choleravibrionen durch beide Mittel. Einsaat: $^1/_{100}$ Tropfen Bouillonkultur Cholera 3. Nährböden: naturalkalische Placentabouillon ohne und mit Zusatz verschiedener Mengen Normalnatronlauge.

| | ohne Alkalizusatz | + 0,3% NaOH | + 0,6% NaOH | + 1,2% NaOH |
|---|---|---|---|---|
| Trypaflavin | 100 000— 200 000 ± | 200 000— 400 000 ± | 200 000— 400 000 ± | 400 000— 800 000 + |
| Brillantgrün | 320 000 -- 640 000 + in allen Proben gleichmäßig. | | | |

Hier wurden Trypaflavin und Brillantgrün vergleichend untersucht. Trypaflavin wirkt in naturalkalischer Bouillon deutlich (etwa



4 mal) schlechter, als bei Alkalizusatz, während Brillantgrün in seiner Wirkung in den 4 verschieden alkalischen Medien unverändert bleibt. Die Einsaat betrug wieder mindestens das Tausendfache der noch in den Nährböden ohne Antisepticum angehenden Keimzahl.

*Tabelle XII.*

Einfluß des Eiweißgehaltes. Entwicklungshemmungsversuch mit Trypaflavin auf Choleravibrionen in enteiweißter Bouillon (Bouillon C) und naturalkalischer Bouillon (Bouillon N) von ziemlich gleichem Alkaligehalt. Volumen 2 ccm. Einsaat $^1/_{100}$ Tropfen Bouillonkultur. $^1/_{100}$ *Millionstel Tropfen wächst in beiden Nährböden noch.*

| Bouillon N | Bouillon C |
|---|---|
| 400 000 − | 100 000 + |

Nach dem in Tabelle XII wiedergebenen Versuch ist es möglich, daß auch Eiweiß zur Verstärkung der Trypaflavinwirkung beitragen kann, denn in der enteiweißten Bouillon erfolgte noch in der Konzentration 1 : 100 000 Trypaflavin Wachstum, während dieses in der naturalkalischen, nach Lackmus ungefähr gleich alkalischen Bouillon auch bei 1 : 400 000 nicht zustande kam. Auch hier war $^1/_{100}$ Tropfen eingesät worden, die Vibrionen gediehen noch bei einer Einsaat von $^1/_{100}$ Millionstel Tropfen in den Kontrollen. Hiernach scheinen Alkalitätsgrad und Eiweißgehalt die Wirkung des Trypaflavins zu steigern, zwei Momente, die sicher für den Ausfall der Vitroversuche in Serum in Betracht kommen.

Unsere im folgenden mitgeteilten Versuche sprechen aber dafür, daß in der Hauptsache bactericide Kräfte des Serums, die schon ohne Trypaflavinzusatz erkennbar sind, ausschlaggebend sind.

Am meisten macht sich begreiflicherweise dieser Einfluß bei solchen Bakterienarten geltend, die an sich bezüglich des Nährbodens anspruchsvoll sind. Ein Beispiel dafür, wie außerordentlich starke Differenzen man dabei erhalten kann und zugleich ein Beispiel, wie schwer es mitunter sein kann, die Ursache dafür in den Nährböden zu finden, gibt der folgende Versuch mit Influenzabacillen (s. Tab. XIII).

Hier hemmt Krystallviolett das Wachstum eines Influenzastammes Gl. in einer Probe *Levinthal*bouillon bis 1 : 100 000, in einer zweiten Sorte des gleichen Nährbodens dagegen bis mindestens 1 : 25 Millionen. *Dabei wächst die Kultur in beiden Bouillonsorten, wie die Kontrollen zeigen, gleich gut.* Dagegen wächst ein anderer, gleichzeitig geprüfter Influenzastamm 62 in der Bouillon b nach 24 Stunden überhaupt nicht und auch nach 48 Stunden nur schwach; er wurde in diesem Nährboden durch Krystallviolett 1 : $2^1/_2$ Millionen gehemmt.

Hieraus möchten wir schließen, daß die Bouillon b auch für die Kultur Gl. ein erheblich schlechterer Nährboden als die andere Bouillonsorte war, obwohl die Kontrolle keinen Unterschied im Wachstum



aufwies. Daneben mögen auch andere Ursachen, vielleicht Dispersitätsänderungen im Sinne von *Langer*, für die Differenzen in Betracht kommen. Daß der Stamm 62 in der Bouillon b durch Krystallviolett weniger stark gehemmt wurde, wie der andere Stamm, der darin viel besser wuchs, beruht offenbar auf ungleicher Empfindlichkeit gegen den Farbstoff.

Angesichts solcher Ergebnisse könnte man die Frage aufwerfen, ob es für die Untersuchung chemischer Stoffe unbedingt richtig ist, die antiseptische Kraft immer ausschließlich in den besten Nährböden, in denen sie wohl am geringsten ist (siehe den Choleraversuch), zu prüfen. Für manche Krankheitserreger ist ja auch der menschliche bzw. tierische Körper nicht der optimale Nährboden. In jedem Fall ist es von Interesse, daß die hier in Frage kommenden chemischen Stoffe unter gewissen Bedingungen noch in außerordentlich schwachen Konzentrationen bakterienfeindlich wirken können, und zwar auch unter solchen Bedingungen, bei denen die betreffenden Erreger anscheinend gut gedeihen. Es sei in diesem Zusammenhange auf die Versuche *Schnabels* hingewiesen, der den Einfluß der Antiseptica auf bestimmte Funktionen der Bakterien, wie die reduzierende Fähigkeit der Pneumokokken auf Methylenblaulösung prüfte und auf diese Weise zum Beispiel beim Optochin viel feinere und regelmäßigere Ausschläge

*Tabelle XIII.*

Entwicklungshemmende Wirkung von Krystallviolett auf 2 Influenzastämme: Influenza Gl. und Influenza 62 in 2 verschiedenen Proben *Levinthal*scher Bouillon a (trübe) und b (klar). Volumen: 2 ccm, Einsaat: 1 Tropfen 24stündiger *Levinthal*bouillonkultur. Bezeichnung siehe unten.

| | | Reihe I. Influenza Gl. Bouillon-Probe a | Reihe II. Influenza Gl. Bouillon-Probe b | Reihe III. Influenza 62 Bouillon-Probe b |
|---|---|---|---|---|
| Krystallviolett | 1 : 50 000 | — | — | — |
| | 1 : 100 000 | — | — | — |
| | 1 : 250 000 | + | — | — |
| | 1 : 500 000 | + | — | — |
| | 1 : 1 Mill. | + | — | — |
| | 1 : 2,5 Mill. | + | — | — |
| | 1 : 5 Mill. | + | — | — |
| | 1 : 10 Mill. | + | — | — (+) |
| | 1 : 10 Mill. | + | — | — (+) |
| | 1 : 25 Mill. | + | — | — (+) |
| Kontrolle (ohne Krystallviolett) | | + | + | — (+) |

— = kein Wachstum. + = starkes Wachstum nach 24 Stunden. (+) = schwaches Wachstum nach 48 Stunden.

Aussaat auf *Levinthal*agar nach 24 Stunden ergibt:

aus Reihe I entsprechend der Entwicklungshemmung 1 : 100 000—
1 : 250 000+,

aus Reihe II nach 24 Stunden aus allen Röhrchen mit Krystallviolett: — nach 48 Stunden von 1 : 2,5 Mill. an ± bzw. +,

aus Reihe III nach 48 Stunden von 1 : 500 000 an +.



erhielt als bei Entwicklungshemmungsversuchen. Möglicherweise werden auch in vivo einzelne Funktionen der Erreger, insbesondere solche, die für die Virulenz wesentlich sind, schon durch sehr schwache Konzentrationen beeinflußt.

Weiterhin haben wir erprobt, ob in einem guten Nährboden die Größe der Einsaat große Schwankungen hervorrufen kann.

*Tabelle XIV.*

Einfluß der Größe der Einsaat auf die Entwicklungshemmung durch Trypaflavin und Salvarsan auf Colibacillen in 2 Bouillonsorten. Kontrollen, in denen $^1/_{10}$ Millionstel Tropfen Bouillonkultur eingesät wurde, waren in beiden Bouillonproben gut angegangen. Volumen 2 ccm, Colistamm-Sammlung. Variierung der Einsaat: 1 Tropfen, $^1/_{100}$, $^1/_{10000}$, $^1/_1$ Millionstel Tropfen Bouillonkultur.

| | | Trypaflavin | | Salvarsan | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Placenta-Bouillon | Pferdefleisch-Bouillon | Placenta-Bouillon | Pferdefleisch-Bouillon |
| $^1/_1$ | Tropfen | 10000 — | 10000 — | 5000 ± | 10000 — |
| $^1/_{100}$ | „ | 10000 — | 10000 — | 10000 — | 10000 — |
| $^1/_{10000}$ | „ | 10000 — | 10000 — | 20000 ± | 10000 — |
| $^1/_1$ Millionstel | „ | 10000 — | 20000 ± | 40000 ± | 10000 — |

Der in Tabelle XIV wiedergegebene Versuch mit Colibacillen in zwei ziemlich gleich guten Nährböden gegenüber Salvarsan und Trypaflavin, zeigt bei Variierung der Einsaat zwischen $^1/_1$ und $^1/_1$ Millionstel Tropfen nur geringe Beeinflussung des Ergebnisses. Das entspricht den Erfahrungen von *Schiemann* und *Ishiwara* bei Salvarsan und den Erfahrungen von *Browning*, *Gulbranson*, *Kenneway* und *Thornton* bei 3,6 Diaminoacridinsulfat, die bei Staphylokokken durch Steigerung der Einsaat um das 10 000fache nur eine Herabminderung der entwicklungshemmenden Kraft dieses Mittels auf den 5. Teil fanden, ebenso den Angaben *Burkards* und *Dorn*. Wie wir sehen werden, liegen die Dinge aber in schlechten Nährböden anders.

So erhielten wir gegenüber Pneumokokken durch Trypaflavin in zwei verschieden guten Nährböden bei absolut gleicher Einsaat, die aber nur für den einen das 10 000fache der auch in der Kontrolle angehenden Keimzahl bedeutete, verschiedene Werte im Entwicklungshemmungsversuch.

*Tabelle XV.*

Entwicklungshemmungsversuch mit Trypaflavin und Pneumokokken in zwei verschiedenen Nährböden. Es werden Kontrollröhrchen von jeder Bouillon mit von $^1/_{10}$ auf $^1/_{1000}$, $^1/_{100000}$, $^1/_1$ Millionstel Tropfen fallenden Mengen der Ausgangskultur besät. Volumen 4 ccm. Einsaat $^1/_{10}$ Tropfen.

| | Serumbouillon | Placentabouillon |
|---|---|---|
| Entwicklungshemmung . . . . . | 200 000 — | 800 000 — |
| Wachstumsgrenze in den Kontrollen. . | $^1/_{100000}$ Tr. + $^1/_1$ Millionst. Tr. — | $^1/_{1000}$ Tr. + $^1/_{100000}$ Tr. — |

Die schlechtere Bouillon weist bei demselben Trypaflavingehalt eine 4 mal stärkere Beeinflussung der Pneumokokken durch das Des-



**inficiens auf, diese Steigerung ist etwas größer, als in dem seinerzeit von *Neufeld* und *Schiemann* in Bestätigung der *Browning*schen Befunde mitgeteilten Versuche mit Pneumokokken in Kaninchenserum, den wir jetzt entsprechend deuten möchten. Es wurde damals nur $^1/_{50}$ Tropfen Serumbouillonkultur als Einsaat benutzt und die Entwicklungshemmung in Serumbouillon war 1:256000±, in Kaninchenserum 1:512000 —, 1:1 Million+. Es ist möglich, daß eine so geringe Einsaat durch den Nährbodenwechsel geschädigt wurde, wenn auch Pneumokokken in Kaninchenserum im allgemeinen sehr gut gedeihen.**

**Die meisten Versuche zur Klärung der stärkeren Wirkung des Trypaflavins in Serum wurden mit Milzbrandbacillen, Colibacillen und Staphylokokken angestellt. Zum Vergleich wurde auch hier das Wachstum in verschiedenen Bouillonsorten herangezogen. Das war insbesondere bei Staphylokokken von hohem Werte, da wir hier in der naturalkalischen Placentabouillon einen Nährboden besaßen, der die Kokken augenscheinlich schädigte. Sie wuchsen darin zwar bei größerer Einsaat üppig, vermochten jedoch nicht Pigment zu bilden und waren morphologisch verändert: die Kokken lagen meist zu zweien, einige auch zu dreien oder vieren, auch einzelne Kokken waren häufig, so daß der hängende Tropfen an Meningokokken erinnerte. Aber auch Milzbrandbacillen gediehen schlechter in Placentabouillon als in der bezüglich der Alkalität auf Typhus eingestellten Pferdefleischbouillon. Es sei dabei bemerkt, daß Staphylokokken nach unseren Erfahrungen durchaus nicht so anspruchslos bezüglich des Nährbodens sind, wie es gewöhnlich angenommen zu werden scheint.**

**Wir geben zunächst die Versuche mit Milzbrand- und Colibacillen wieder.**

*Tabelle XVI.*

**Abtötungs- und Entwicklungshemmungsversuch in aktivem (24 Stunden alten) Hammelserum, Pferdefleischbouillon und Placentabouillon gegenüber *Milzbrand*-bacillen (sporenfreier Stamm Amtsberg) mit Salvarsan und Trypaflavin. Volumen 2 ccm. Einsaat $^1/_5$ Tropfen Bouillonkultur. Aussaat: 1 Tropfen auf Schrägagar. Die 3 Nährböden sind auf Bactericidie geprüft durch Einsaat fallender Keimmengen ($^1/_5$, $^1/_{10}$, $^1/_{50}$ usw. Tropfen). Für die Abtötung ist der Grenzwert, der noch Abtötung erreichte, für die Entwicklungshemmung der noch Wachstum ergebende, angegeben.**

| Keimentnahme nach | Trypaflavin | | | Salvarsan | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | aktives Hammelserum | Pferdefleisch-Bouillon | Placenta-Bouillon | aktives Hammelserum | Pferdefleisch-Bouillon | Placenta-Bouillon |
| Abtötung 2 Std. | 50000 — | 200000 — | 200000 — | 100000 ± | 1,6 Mill. ± | 6,4 Mill. ± |
| Abtötung 24 Std. | 50000 — | 200000 — | 200000 — | 200000 ± | 1,6 Mill. — | 3,2 Mill. — |
| Entwicklungshemmung | 100000 + | 400000 + | 400000 + | 200000 + | 3,2 Mill. + | 6,4 Mill. + |
| Wachstumsgrenz. | $^1/_1$ Mill. Tr. | $^1/_{10000}$ Tr. + | $^1/_{5000}$ Tr. + | vgl. Trypaflavin | | |
| in den Kontrollen | $^1/_5$ M. Tr. — | $^1/_{50000}$ Tr. — | $^1/_{10000}$ Tr. — | | | |





*Tabelle XVII.*

**Abtötungs- und Entwicklungshemmungsversuch in aktivem (24 Stunden alten) und inaktivem Hammelserum (dasselbe Serum $^1/_2$ Stunde bei 56°) und Pferdefleischbouillon gegenüber *Colibacillen* (Coli-Maus = beweglich aus Maus isoliert) mit Salvarsan und Trypaflavin. Volumen 2 ccm. Einsaat: 1 Tropfen Bouillonkultur. Die 3 Nährböden durch Einsaat fallenden Keimmengen auf Bactericidie geprüft ($^1/_1$, $^1/_{10}$, $^1/_{100}$ Tropfen usw.). Keimentnahme 1 Tropfen auf 1 Schrägagarröhrchen.**

| Keimentnahme nach | Trypaflavin | | | Salvarsan | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | aktives Hammelserum | inaktives Hammelserum | Pferdefleisch-Bouillon | aktives Hammelserum | inaktives Hammelserum | Pferdefleisch-Bouillon |
| Abtötung 2 Std. | 16000+ | 16000+ | 32000− | 4000+ | 4000+ | 4000+ |
| Abtötung 24 Std. | 256000− | 128000− | 128000− | 4000− | 4000− | 8000− |
| Entwicklungshemmung | 1,6 Mill.+ | 512000+ | 256000+ | 8000+ | 8000+ | 16000+ |
| Wachstumsgrenz. in den Kontrollen | $^1/_{100}$ Tr. + $^1/_{1000}$ Tr. − | $^1/_{1000}$ Tr. + $^1/_{10000}$ Tr. − | $^1/_{10}$ Mill. Tr. + o. Grenz. | vgl. Trypaflavin | | |

Ein früher angestellter Entwicklungshemmungsversuch mit Trypaflavin in aktivem und inaktivem Kaninchenserum hatte bei Einsaat von $^1/_{10}$ Tropfen Agarabschwemmung in beiden Serumproben die Grenze 1 : 200 000 — ergeben, während in Bouillon bei 1 : 100 000 das Wachstum aufhörte. Da Kaninchenserum in der Regel sehr starke bactericide Eigenschaften gegenüber Milzbrandbacillen besitzt, so ist es von vornherein wahrscheinlich, daß die Steigerung der Trypaflavinwirkung auf Kombination mit der Serumbactericidie beruht. In aktivem Hammelserum dagegen wachsen die Bacillen gut.

Es wurden in Tabelle XVI Trypaflavin und Salvarsan in aktivem Hammelserum, Pferdefleischbouillon und Placentabouillon im Abtötungs- und Entwicklungshemmungsversuch geprüft. Durch Beimpfung von Kontrollen mit fallenden Keimmengen ergab sich, daß Hammelserum der beste Nährboden war, dementsprechend war der Ausfall des Versuches dem in Kaninchenserum ganz entgegengesetzt. Trypaflavin wirkte 4 mal schlechter in Serum als in Bouillon entwicklungshemmend und abtötend. Bei Salvarsan ergaben sich noch viel stärkere Differenzen: in der weniger gut geeigneten Placentabouillon war die Beeinflussung doppelt so stark als in Pferdefleischbouillon und 16- bzw. 32 mal stärker als in Serum. Hier muß noch ein weiteres Moment hinzukommen; es ist anzunehmen, daß die Wirkung des Salvarsan in Hammelserum noch durch besondere, bisher unbekannte Faktoren behindert wird. Dies Verhalten wurde schon von *Schiemann* bei Versuchen mit Salvarsan in verschiedenen Serumsorten beobachtet.

Der Versuch (Tab. XVII) mit Colibacillen, die in Hammelserum schlechter als in Bouillon gedeihen, in aktivem noch etwas schlechter als in inaktivem, ergibt für Salvarsan aus dem ebengenannten Grunde keinen



**Unterschied zugunsten des besseren Nährbodens, vielmehr eine geringere Beeinflussung in Serum, die Differenz ist aber bedeutend geringer als im Milzbrandversuch; bei Trypaflavin ist bei der ersten Entnahme nach 2 Stunden die Abtötung der Colibacillen in Serum nur halb so stark wie in Bouillon, bei der zweiten Entnahme nach 24 Stunden und bei der Entwicklungshemmung macht sich die stärkere bactericide Kraft besonders des aktiven Serums geltend. Auch in anderen Versuchen sehen wir, daß die schädigende Wirkung des Serums *langsam* zum Ausdruck kommt.**

*Tabelle XVIII.*

**Abtötungs- und Entwicklungshemmungsversuch in aktivem (24 Stunden alten) Kaninchenserum, Pferdefleischbouillon und Placentabouillon gegenüber Colibacillen (Coli-Sammlung) und Staphylococcus aureus mit Trypaflavin. Volumen 2 ccm. Einsaat: 1 Tropfen Bouillonkultur von Colibacillen, $^1/_{100}$ Tropfen Staphylokokkenbouillonkultur. Die 3 Nährböden werden durch Einsaat fallender Keimmengen wie in Tabelle XVII geprüft.**

| Keimentnahme nach | Colibacillen (Einsaat $^1/_1$ Tropfen) | | | Staphylokokken (Einsaat $^1/_{100}$ Tropf.) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | aktives Kaninchen-serum | Pferde-fleisch-Bouillon | Placenta-Bouillon | aktives Kaninchen-serum | Pferde-fleisch-Bouillon | Placenta-Bouillon |
| Abtötung 1 Std. | 25000+ | 2000+ | 2000+ | 25000+ | 50000− | 50000± |
| Abtötung 6 „ | 25000+ | 4000− | 4000− | 50000− | 50000− | 50000− |
| Abtötung 24 „ | 400000± | 8000− | 8000− | 100000± | 50000− | 200000− |
| Entwicklungs-hemmung | 400000− | 16000+ | 16000+ | 200000− | 100000+ | 400000+ |
| Wachstumsgrenz. in den Kontrollen | $^1/_1$ Tr. + $^1/_{10}$ Tr. − | $^1/_{10}$ Millionstel Tr. + (ohne Grenze) | | $^1/_{1000}$ Tr. + $^1/_{100000}$ T. − | $^1/_{100000}$ Tr. + o. Grenz. | $^1/_{100}$ Tr. + $^1/_{1000}$ Tr. − |

*Tabelle XIX.*

**Abtötungs- und Entwicklungshemmungsversuch in inaktivem Kaninchenserum, Pferdefleischbouillon und Placentabouillon gegenüber Colibacillen (Coli-Sammlung) und Staphylococcus aureus mit Trypaflavin. Volumen 2 ccm. Einsaat: 1 Tropfen Colibouillon, $^1/_{10}$ Tropfen Staphylokokkenbouillon. Zeichen wie dort.**

| Keimentnahme nach | Colibacillen (Einsaat 1 Tropfen) | | | Staphylokokken (Einsaat $^1/_{10}$ Tropfen) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | inakt. Kanin.-Serum | Pferdefleisch-Bouillon | Placenta-Bouillon | inakt. Kanin.-Serum | Pferdefleisch-Bouillon | Placenta-Bouillon |
| Abtötung 1 Stunde | 4 000 − | 2 000 − | 2 000 − | 32 000 ± | 32 000 ± | 64 000 ± |
| Abtötung 6 „ | 16 000 − | 8 000 − | 8 000 − | 128 000 ± | 128 000 − | 256 000 − |
| Abtötung 24 „ | 64 000 − | 16 000 − | 16 000 − | 128 000 − | 64 000 − | 256 000 ± |
| Entwicklgs.-hemmung | 128 000 + | 32 000 + | 32 000 + | 256 000 + | 128 000 + | 256 000 − |
| Wachstums-grenze in d. Kontrollen | $^1/_{1000}$ Tr. + (ohne Grenze) | $^1/_{10}$ Millionstel Tr. + (ohne Grenze) | | $^1/_{100000}$ Tr. + (ohne Grenze) | $^1/_{100000}$ Tr. + (ohne Grenze) | $^1/_{10}$ Tr. + $^1/_{1000}$ Tr. − |





In den Tabellen XVIII, mit aktivem und XIX, mit inaktivem Kaninchenserum wurde die Wirkung des Trypaflavins auf Colibacillen und Staphylokokken studiert. Wenn auch die außerordentliche Steigerung der Wirkung des Trypaflavins auf Colibacillen auffällig ist, so läßt sie sich in einfacher Weise durch bactericide Eigenschaften des Kaninchenserums erklären, was besonders dadurch veranschaulicht wird, daß in dem Versuch mit aktivem Serum (Tab. XVIII) bereits $^1/_{10}$ Tropfen, die 10 mal kleinere Einsaat, als sie im Versuche benutzt wurde, vom Serum allein abgetötet wird. Im inaktiven Serum wurden leider nicht genügend Kontrollen angelegt, um den Nachweis der Höhe seiner bakterienfeindlichen Eigenschaften zu erbringen.

Die starke Beeinflussung der Staphylokokken in Kaninchenserum durch Trypaflavin erweist sich ebenfalls als eine Kombination zwischen der bactericiden Kraft des Serums und des Trypaflavins, wobei *die zum Vergleich herangezogene Placentabouillon noch stärker keimvermindernd wirkt, als Serum und dementsprechend Trypaflavin in ihr die höheren antiseptischen Werte erzielt.*

*Durch diese Versuche scheint es uns erwiesen zu sein, daß die Deutung, die Browning und Mitarbeiter ihren Entwicklungshemmungs- und Abtötungsversuchen mit Trypaflavin und anderen Acridinpräparaten gegenüber Staphylokokken und Colibacillen in Kaninchenserum gegeben haben, und die darauf hinauskommt, daß den Acridinpräparaten eine besondere Stellung unter allen bekannten Antiseptica infolge der Steigerung ihrer Wirkung in Serum anzuweisen sei, nicht zutreffend ist. Vielmehr ist* (obwohl, wie oben erwähnt, auch andere Momente mitspielen mögen) *die schwere Schädigung, die beide genannten Bakterienarten in Kaninchenserum erfahren, der hauptsächlichste Grund für dieses Verhalten.* In dem weniger bactericiden Hammelserum ergab sich dementsprechend eine weit geringere Erhöhung der Wirkung des Trypaflavinserums im Vergleich zu Trypaflavinbouillon. Inwieweit hierbei die verschiedene Alkalität der beiden Serumarten eine Rolle spielt, bleibe dahingestellt. Bekanntlich haben *Behring* und andere Autoren bereits die Alkalität des Serums mit zur Erklärung der natürlichen Bactericidie einiger Serumarten gegenüber gewissen Keimen (Rattenserum gegenüber Milzbrandbacillen) herangezogen. Nach dem bedeutenden verstärkenden Einfluß, den die Alkalität nach Tab. XI auf die Wirkung des Trypaflavins ausübte, während sie auf Brillantgrün ohne Einfluß blieb, muß daran gedacht werden, daß sie auch direkt die Wirkung des Trypaflavins verstärkt[1]). Als allgemeine Regel kann jedenfalls eine derartige Verstärkung der Wirkung des Trypaflavins in Serum nicht angenommen werden. Das geht schon aus den Ver-

[1]) Vgl. die inzwischen erschienene Arbeit von *L. Michaelis*, C. f. B. I. Abt. Ref. **73**, 529. 1922.

suchen in Tab. XVIII und XIX hervor, wo dasselbe Serum im Versuch mit Staphylokokken einen ganz anderen Einfluß hat, wie im Versuch mit Colibacillen. Ferner werden gerade die hoch beeinflußten Hühnercholerabacillen in Kaninchenserum nicht stärker gehemmt, als in Bouillon. Wie schon früher von uns mitgeteilt, fallen ferner die Versuche mit Hühnercholera in Kaninchenserum regelmäßig aus[1]), im Gegensatz zu Versuchen in Menschenserum, das diese Erreger in individuell verschiedenem Grade schädigt. Die Wirkung des Serums — und dasselbe gilt für andere schlechte Nährböden — ist natürlich nicht einfach so zu erklären, daß es einen bestimmten Teil der Einsaat abtötet und die übrigen Bakterien unbeeinflußt läßt, dann würde z. B. in Tab. XVII, Spalte 1 (Trypaflavin in Hammelserum gegen B. Coli) über 99% der Einsaat übrigbleiben; vielmehr dürfen wir annehmen, daß in solchen Nährböden zunächst die Entwicklung der Bakterien in den ersten Stunden gehemmt ist, so daß zu der Zeit, wo der Einfluß eines langsam wirkenden Antisepticums sich geltend zu machen beginnt, nur wenige Keime vorhanden sind. Die eingesäten Bakterien werden ferner auch wohl in gewisser Weise geschädigt und dadurch vielleicht empfindlicher gegen geringe Konzentration an bestimmter Antiseptica sein. Jedenfalls dürfte es sich um eine Kombination verschiedener Schädlichkeiten handeln, deren Erklärung im einzelnen wie ja auch sonst bei kombinierten Giftwirkungen schwierig ist. Auch einige Versuche in Pferdeserum und Menschenserum, sowie Meerschweinchenserum fielen bei Hühnercholerabacillen in diesem Sinne aus.

*Tabelle XX.*

Abtötungsversuch in aktivem und inaktivem Kaninchenserum (24 Stunden alt, das inaktive bei 56° 1/2 Std. inaktiviert), defibriniertem Kan.-Blut und Bouillon mit Trypaflavin gegenüber Hühnercholerabacillen. Volumen 2 ccm. Einsaat: 1 Tropfen Agarabschwemmung (1 Schrägröhrchen in 2 ccm Bouillon). Aussaat: 1 Tropfen auf Schrägagar.

| Keimentnahme | aktives Kaninchenserum | inaktiv. Kaninchenserum | defibriniertes Blut | Bouillon |
|---|---|---|---|---|
| Nach 30 Minut. | 50 000 ± | 100 000 ± | 50 000 ± | 100 000 ± |
| „ 2 Stund. | 100 000 ± | 250 000 ± | 100 000 ± | 250 000 ± |
| „ 24 „ | 1 Mill. — | 1 Mill. — | 500 000 — | 1 Mill. — |
| Entwicklungshemmung | 2,5 Mill. + | 2,5 Mill. + | 1 Mill. — (+) | 5 Mill. + |

In Tabelle XX wurde die abtötende und entwicklungshemmende Kraft des Trypaflavins auf Hühnercholerabacillen in aktivem und

[1]) In der Mitteilung von *Neufeld, Schiemann* und *Baumgarten* Dtsch. med. Wochenschr. 1920, S. 1013, ist an dieser Stelle ein Druckfehler stehen geblieben; es soll dort, wie auch aus dem Zusammenhang hervorgeht, heißen: „recht regelmäßig" anstatt „nicht regelmäßig".



inaktivem Kaninchenserum, defibriniertem Blut und in Bouillon geprüft. In Tabelle XXI wurden die gleichen Prüfungen in Pferdeblut und Serum vorgenommen.

*Tabelle XXI.*

Abtötungsversuch mit Trypaflavin auf Hühnercholerabacillen. Dieselbe Versuchsanordnung wie in Tab. XXI in Pferdeblut und Serum (24 Std. nach Entnahme).

| Keimentnahme | aktives Serum | inaktives Serum | defibriniertes Blut | Bouillon |
|---|---|---|---|---|
| Nach 30 Minut. | 50 000 ± | 50 000 ± | 50 000 ± | 50 000 ± |
| „ 2 Stund. | 100 000 ± | 100 000 ± | 100 000 ± | 250 000 ± |
| „ 24 „ | 2,5 Mill. ± | 1 Mill. ± | 500 000 ± | 1 Mill. – |
| Entwicklungshemmung | 5 Mill. + | 2,5 Mill. ± | 500 000 -- (+) | 2,5 Mill. + |

In Pferdeserum (Tab. XXI) ist die Abtötung in 24 Stunden zwar etwas stärker als in Bouillon, in Kaninchenserum, in dem die Hühnercholerabacillen gut wachsen, erfolgt Abtötung in Bouillon und Serum bei gleicher Konzentration des Mittels; in beiden Versuchen erfolgt die Abtötung in Serum etwas langsamer, entsprechend den Versuchen von *Burkard* und *Dorn* mit Diphtheriebacillen in Menschenserum bzw. Kochsalzlösung. Die gleichzeitig geprüfte Entwicklungshemmung ist in Kaninchenserum eine Stufe niedriger, in aktivem Pferdeserum eine Stufe höher als in Bouillon, man könnte also nach diesem Versuch behaupten, Kaninchenserum schwächt das Trypaflavin in seiner Wirkung ab, Pferdeserum erhöht seine Wirkung, während aus dem Umstande, daß Colibacillen in Kaninchenserum durch Trypaflavin stärker beeinflußt werden als in Bouillon, hervorgeht, daß diese Wirkungen von den bactericiden Eigenschaften des vorliegenden Serums gegenüber den jeweils benutzten Keimen abhängen.

Die antiseptische Kraft des Trypaflavins in defibriniertem Blut ist deutlich, aber nicht sehr hochgradig abgeschwächt. In dieser Beziehung verhält sich das Trypaflavin ganz ähnlich wie Salvarsan und Optochin in den Versuchen von *Schiemann* und *Ishiwara*.

Fassen wir zusammen, so ist aus unseren Versuchen ersichtlich, daß Schwankungen in der Zusammensetzung der Nährböden geeignet sind, die bei Desinfektions- und Entwicklungshemmungsversuchen erhaltenen Zahlen stark zu beeinflussen. Schon *Behring* und seine Mitarbeiter haben sich sehr eingehend mit dieser Fehlerquelle des Nährbodens beschäftigt. So erwähnt *Boer* die Schwierigkeit, einen Nährboden zu finden, in dem alle mit einem Mittel gleichzeitig untersuchten Bakterien gleichmäßig gut wachsen. Spätere Untersucher haben häufig ihre Versuchsanordnung so eingerichtet, daß sie umgekehrt in einer Anzahl von Versuchen eine Reihe von Mitteln gegenüber nur einem Bacterium in einem für dieses geeigneten Nährboden prüften. Diese



Fehler erscheinen bei den stark wirkenden Substanzen natürlich größer. Bei den Farbstoffen ist wegen ihres kolloiden Charakters noch besondere Vorsicht am Platze. Manche Autoren, wie *Eisenberg* und *Churchmann* haben vorgezogen, die antiseptische Kraft zunächst in festen Nährböden festzustellen. Die Abtötung läßt sich aber so nicht bestimmen. Nun hat *Behring* bekanntlich Serum (und zwar Rinderserum) als einen konstanten und den Körperflüssigkeiten am nächsten kommenden Nährböden für Desinfektionsversuche empfohlen. Das läßt sich aber schon insofern nicht durchführen, als viele Bakterien in Serum nicht oder nur bei großer Einsaat angehen. Vielleicht könnten die absoluten Zahlen verschiedener Untersucher dadurch in höherem Maße vergleichbar werden, daß nach *Sörensens* und *Michaelis*' Methoden Nährböden von optimaler Reaktion für jede Bakterienart in einheitlicher Weise fertiggestellt werden.

Andererseits kann die Analyse der Schwankungen vielleicht noch manche wertvolle Aufschlüsse über die Art der Einwirkung der chemischen Substanzen auf die Bakterien und deren Teilfunktionen erbringen. In dieser Beziehung sei auf die nach Abschluß unserer Arbeit erschienenen interessanten Versuche von *Schnabel* über Überempfindlichkeit und Festigung von Bakterien, gemessen an Beeinflussung des Reduktionsvermögens von Methylenblaulösung verwiesen.

---

## Literaturverzeichnis.

*Behring*, Ges. Abhandlungen. — *Baumgarten*, Sitzg. d. Mikrobiol. Ges. v. 11. IV. 1921. Berl. klin. Wochenschr. 1921, S. 1418. — *Browning* und *Gilmour*, Journ. of pathol. a. bacteriol. **18**, 144. 1913. — *Browning, Gulbranson, Kenneway* und *Thornton*, Brit. med. journ. 1917. — *Browning, Gulbranson*, Proc. Royal Soc. Ser. B, 676. 2. April 1918. — *Burkard* und *Dorn*, Bruns' Beitr. z. klin. Chirurg. **119**. — *Churchmann*, Journ. of exp. Med. **16**, 221. 1912 u. **17**, 373. 1913. — *Eisenberg*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I Orig., **71**, 420. 1913. — *Elbs*, Handwörterbuch d. Naturwissensch. **3**, 871. 1913. — *Fürstenau*, Zeitschr. f. Augenheilk. **40**, 1. 1918. — *König*, Handwörterbuch d. Naturwissensch. **1**, 101. 1912. — *Lange*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **94**, 125. 1921. — *Langer*, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, S. 1015 und Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. II Ref., **73**, 145. 1922. — *Löffler*, Dtsch. med. Wochenschr. 1909, Nr. 30. — *Morgenroth* und *Bieling*, Berl. klin. Wochenschr. 1917, Nr. 30. — *Neufeld* und *Schiemann*, Dtsch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 31. — *Neufeld, Schiemann* und *Baumgarten*, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 37. — *Reichenbach* diese Zeitschrift **69**, 171. — *Reichert*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I Orig., **87**, 118. 1921. — *Römer, Gebb, Löhlein*, v. Graefes Arch. f. Ophthalmol. **87**, 1. 1914. — *Schiemann* u. *Ishiwara*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **77**, 49. 1914. — *Schiemann*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap., Orig., **24**, 167. 1916. — *Shiga*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap., Orig., **18**, 65. 1913. — *Schultz*, Farbtafeln. — *Schnabel*, Biochem. Zeitschr. **112**, 112. 1920. — Derselbe, diese Zeitschrift **96**, 351. 1922.

---



(Aus dem Institut „Robert Koch".)

# Chemotherapeutische Versuche mit 3,6-Diaminoacridinverbindungen und anderen Farbstoffen.

Von

Dr. **O. Schiemann,**

Abteilungsleiter am Institut.

Unsere Versuche mit Acridinverbindungen, über die in zwei Mitteilungen[1]) bereits vorläufig berichtet wurde, bestanden in nebeneinander herlaufenden Prüfungen der therapeutischen Wirksamkeit derselben und ihrer desinfizierenden Kraft im Reagensglas gegenüber den im Tierversuch untersuchten Infektionserregern. Die Reagensglasversuche sind in der vorstehenden Arbeit besonders geschildert worden, hier muß nur auf sie Bezug genommen werden, um einen Zusammenhang der therapeutischen Eigenschaften mit desinfizierenden Fähigkeiten aufzuzeigen.

Die Choleraversuche sind bereits von *Baumgarten*[2]) mitgeteilt worden; von den hier mitgeteilten Versuchen ist ein großer Teil der Mitarbeit von Fräulein *Karlbaum* zu danken.

Geprüft wurden den verschiedenen Erregern gegenüber nicht immer dieselben Mittel, jedoch kamen stets das Trypaflavin (3,6-Diamino-10-Methylacridiniumchlorid) und eine oder die andere der nicht methylierten 3,6-Diaminoacridinverbindungen, die von *Browning* unter dem Namen Proflavin zusammengefaßt worden sind (das Sulfatsalz, das Nitratsalz, das nicht methylierte Chlorid, die Base) in Anwendung. Betreffs der chemischen Konstitution sei auf die vorstehende Arbeit von *Schiemann* und *Baumgarten* verwiesen. Nach *Ehrlich* ist die Methylgruppe von Bedeutung, indem die Wirksamkeit des Trypaflavin gegenüber der Trypanosomeninfektion der Mäuse im Vergleich mit der nicht methylierten Substanz erhöht ist; dasselbe fanden *Browning* und *Gulbransson* für Trypanosoma Rhodesiense. Nach unseren Reagensglasversuchen ergab sich ebenfalls eine Erhöhung der bactericiden und entwicklungshemmenden Kraft des Trypaflavin auf Hühnercholerabacillen, die durch Trypaflavin bis 1 : 2 millionenfacher Verdünnung beeinflußt wurden, während die nicht methylierten Verbindungen nur bis 1 : 300 000 die Entwicklung

[1]) *Neufeld* und *Schiemann*, Dtsch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 31. — *Neufeld*, *Schiemann* und *Baumgarten*, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 37.

[2]) *Baumgarten*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **91**, 511.



aufhoben. Auch gegenüber Gonokokken, die noch stärker durch Trypaflavin beeinflußt werden, ergab sich ein — wenn auch geringer — Unterschied zugunsten der methylierten Substanz. Choleravibrionen, Shigabacillen, Milzbrand- und Diphtheriebacillen sowie Pneumokokken und Streptokokken wurden von den nicht methylierten Substanzen ebenso hoch (bis 1 : 300 000, d. h. so hoch wie Hühnercholerabacillen) beeinflußt. Ein noch höher methyliertes Homologes des 3,6-Diaminoacridin, das Flavicid, wurde von *Langer* elektiv gegen Diphtheriebacillen und Staphylokokken wirksam befunden. Nach einem von uns angestellten Reagensglasversuch konnten wir bestätigen, daß die Wirkung auf Diphtheriebacillen weit größer war als die des Trypaflavin; dagegen war — abgesehen von Staphylokokken — seine entwicklungshemmende Kraft gegen Septicämieerreger nicht größer oder etwas geringer als die des Trypaflavin. Da das Präparat in Mengen von 1 : 6000 i. per. noch 20 g schwere Mäuse vergiftet, also bedeutend giftiger ist als Trypaflavin, haben wir von weiteren Tierversuchen abgesehen.

Als Kriterium für die Wirksamkeit der Mittel in vivo zogen wir nicht nur gelungene Heilungen heran, sondern auch Verzögerungen des Todes gegenüber Kontrolltieren, ja auch den Tod der Versuchstiere gleichzeitig mit den Kontrollen, sofern bei der Sektion keine oder nur ganz spärliche Bakterien im Gegensatz zu den Kontrollen, die reichlich Bakterien enthielten, aufgefunden wurden. Wir gingen dabei von der durch *Ehrlich* mit Glück verfolgten Idee aus, daß auch Substanzen, die an sich wegen geringer Parasitotropie oder zu großer Organotropie keine praktische Bedeutung haben, dennoch beachtenswert sind, weil durch Variierung ihres chemischen Aufbaues andere Mittel von gewünschter spezifischer Giftigkeit gewonnen werden können.

Wir haben die meisten Tiere bereits nach 5 Minuten nach der Infektion behandelt, ferner — besonders bei der in der Regel außerordentlich schnell zum Tode führenden Hühnercholerainfektion — die Infektion dadurch milder zu gestalten versucht, daß wir dazu übergingen, subcutan statt intraperitoneal zu impfen, und auch dadurch, daß wir den Bakterienstamm wochen-, ja monatelang ohne Tierpassage fortzüchteten, ehe wir ihn zum Versuch verwendeten. Dabei suchten wir stets festzustellen, das Wievielfache einer tödlichen Dosis zur Infektion verwendet war, indem wir eine Anzahl Kontrollen mit von 1:10:100 usw. fallenden Dosen der zur Infektion der behandelten Tiere verwendeten Aufschwemmung infizierten. Wir haben mehrere Versuche mit großen (100- bis über 1000fach tödlichen) Dosen angestellt, während es andererseits auch gelang, eine ganz milde Infektion herbeizuführen, wo z. B. die 10fach geringere Dosis erst in 3—4 Tagen oder auch überhaupt nicht sicher tötete, in einigen Versuchen mußte auch



die Erfahrung gemacht werden, daß die Kontrollen alle oder zur Hälfte überlebten. Diese Versuche sind aber für die Beurteilung des therapeutischen Wertes eines Mittels ebenfalls von Belang, indem ein Überleben aller Versuchstiere unter solchen Bedingungen immerhin einen Erfolg darstellt. Andererseits ist zu erwarten, daß hierbei eine schädliche Wirkung parasitotroper Substanzen, der „Effectus contrarius", am ehesten zutage tritt. Wie *Ehrlich* fand, können subtherapeutische Dosen die Parasiten zu erhöhter Vermehrung anregen. Überwiegt die Parasitotropie in hohem Grade die Organotropie eines Mittels, so wird man leicht die schädigende (stimulierende) Wirkung vermeiden können, ist die Zone eng, so kann die Dosierung des Mittels angesichts individueller Verschiedenheiten der Giftresistenz äußerst erschwert werden.

### *Versuche an Mäusen bei Hühnercholerainfektion.*

Zur Infektion diente ein Hühnercholerastamm, der im Jahre 1915 gelegentlich einer Hühnerepizootie von mir isoliert wurde und als Exsiccatormaterial aufbewahrt war. Dieser Stamm wuchs anfänglich auf Agar schleimig, jedoch ließen sich die beiden bekannten typischen Kolonieformen aus ihm abspalten (die schleimigzerfließliche und die streptokokkenähnliche). Er hatte zunächst eine mäßige Virulenz, aber mit $^1/_{10000}$ oder $^1/_{100000}$ Öse Agarkultur i. per. infizierte Tiere starben in der Regel in 24 Stunden. Subcutane Infektion verlief insofern milder, als sie in der Regel erst in 48 Stunden tötete. *Dieser Stamm wird im folgenden als Modifikation I angeführt.*

Nach einer Passage durch ein Huhn änderte der Stamm seine Virulenz: Auch $^1/_1$ Milliardstel Öse tötete i. per. in 24 Stunden, subcutan in 48 Stunden, und zwar regelmäßig. *Dabei wurde auch ein erheblicher morphologischer Unterschied festgestellt,* insofern, als die in Blut- und Milzausstrichen nachgewiesenen Bacillen stets die typische kleine Form aufwiesen, während die Modifikation I oft recht große, friedländerbacillenähnliche, zuletzt riesige blasige oder ringförmige Formen annahm, die wohl als Degenerationsformen anzusehen sind. *Der hochvirulente Stamm wird in folgendem als Modifikation II bezeichnet.*

Nachdem die Modifikation II noch weitere Hühnerpassagen durchgemacht hatte, gelang es, daraus die kleine streptokokkenähnliche Kolonieform abzuspalten und (bis zu 1 Jahr) konstant zu erhalten; diesen Stamm bezeichnen wir als *Modifikation III.* Da die Agarkulturen dieses Stammes sich ähnlich wie Milzbrandbacillen wegen ihrer Trockenheit schlecht verreiben ließen, wurde der Stamm in Kubikzentimeter Bouillonkultur dosiert. Er zeigte, auch nachdem er $^1/_2$ Jahr ohne Tierpassage fortgeführt war, eine erhebliche Virulenz: $^1/_{100000}$ ccm Bouillonkultur s. c. tötete in der Regel in 2 Tagen, $^1/_1$ Millionstel ließ mitunter Tiere am Leben. Die Bacillen in den Organen waren nicht ganz so typisch wie bei der Modifikation II, auch 2 Passagen durch Tauben ließen die Neigung, größere friedländerähnliche Formen in den Organen der Tiere zu entwickeln, nicht auf die Dauer zurücktreten.

Geprüft wurden von 3,6-Diaminoacridinverbindungen: die Base, das Nitrat und Sulfat und das Trypaflavin, letzteres als neutrales Trypaflavin. Ferner Aurophosphin 4 G extra und G extra, sowie Chrysanilin (Phosphin extra) und Acridinorange Nr. 0. Letztere Substanz sowie die 3 Phosphine enthalten ebenfalls den Acridinring. Schließlich wurden noch einige ganz anderen chemischen Gruppen angehörende



**Präparate versucht: Tryparosan, Trypanrot und Trypanblau, die als Trypanosomenmittel bekannt sind, das Chinaldinderivat Chinolingelb wasserlöslich, das sich durch große Ungiftigkeit auszeichnet und das Isochinolinderivat Chinolinrot, dessen Konstitution noch nicht feststeht.**

Die Versuchsanordnung ist dieselbe wie bei den von *Baumgarten* mitgeteilten Choleraversuchen, die injizierte Menge ist stets auf 1,0 ccm pro 20 g Gewicht berechnet, es wurden aber 0,2 der 5fach konzentrierteren Verdünnung (in Wasser) injiziert, um nicht zu große Flüssigkeitsmengen unter die Haut zu bringen. Dabei sahen wir bei den 3,6-Diaminoacridinverbindungen, z. B. nach Injektion von 0,2 ccm 1 : 200 Nitrat (berechnet als 1 ccm 1 : 1000) an Tieren, die 3 Tage nach der Behandlung zur Sektion kamen, oft noch eine deutliche Gelbfärbung der Cutis um die Injektionsstelle und eine ödematöse Schwellung des Unterhautbindegewebes. Jedoch war die lokale Schädigung nicht immer in gleichem Maße ausgesprochen.

*Folgende Beispiele, die den Protokollen entnommen sind, bringen nicht etwa unsere besten Erfolge, vielmehr wurden sie ausgewählt, um die Grenzen der Wirksamkeit der Mittel aufzudecken.* Zur Beurteilung des unter günstigen Umständen Erreichbaren müssen die Übersichtstabellen II und III eingesehen werden.

In Versuch 1 erweist sich Trypaflavin, auch bei Anwendung 1 Stunde nach der Infektion subcutan gegeben, von gewisser Wirksamkeit; dabei wurden in den Versuchen mit subcutaner Infektion die Mittel stets auf der anderen Körperseite injiziert. Maus 3 stirbt bei Anwendung der größten tolerierten Trypaflavindosis 1 : 2500 um einen Tag verzögert und ohne daß Bacillen mikroskopisch oder kulturell in Milz, Blut und Peritoneum nachgewiesen werden konnten. Eine etwas geringere Dosis, 1 : 3000, übt keinen erkennbaren Einfluß aus (Maus 4), während wieder bei Anwendung von 1 : 4000 Trypaflavin Tod ohne Bacillen, aber bereits nach 48 Stunden, erfolgt. Der therapeutische Effekt ist gering und das Ergebnis des Versuches auch insofern ungenügend, als sich aus ihm keine Folgerungen für eine Dosierung des Präparates ergeben. Wir haben angenommen, daß die Mäuse eine wechselnde Toleranz gegenüber dem Trypaflavin besitzen, ähnlich wie es *Kolle* an Hühnern bei Quecksilberpräparaten fand. Es ist aber auch möglich, daß gerade in diesem Falle, wo das Präparat erst 1 Stunde nach der Infektion angewendet wurde, durch die Behandlung in größerer Menge freiwerdende Endotoxine die Giftwirkung verstärken. In Versuch 2 zeigt sich die große Giftigkeit des Präparates. Es wurden in diesem Versuch 3 Mäuse i. ven. mit 1 : 2500 Trypaflavin prophylaktisch gespritzt, 2 davon erlagen einem schweren Kollaps, während das 3. Tier sich erholte und nach $1^1/_2$ Stunden infiziert werden konnte. Auch das mit 1 : 3000 gespritzte Tier kollabierte schwer, erholte sich jedoch; erst 1 : 4000 wurde ohne Kollaps ertragen, und diese Maus blieb (als Giftkontrolle) dauernd am Leben. Der therapeutische Effekt der intravenösen Behandlung ist wenig befriedigend (sowohl bei prophylaktischer Behandlung, als bei Injektion gleich nach der Infektion). Auch die mit 1 : 4000 i. ven. behandelte Maus stirbt mit wenig Bacillen, ebenso wie die mit 1 : 2500 und 1 : 3000, d. h. mit bei gesunden Tieren bereits schädlichen Dosen behandelten Tiere. Es ist wohl anzunehmen, daß kleinere Dosen besser gewirkt hätten, denn bei subcutaner Anwendung wurden 3 Mäuse (9, 10 und 11) gerettet, und eine 4. (Maus 8) starb mit deutlicher Verzögerung.



*Tabelle I. Versuche an Mäusen mit Hühnercholerainfektion.*

$^1/_{10\,000}$ Öse Ag.K. = 0,2 ccm der Verdünnung 1 : 2000 einer Aufschwemmung aus 1 Öse Agarkultur in NaCl-Lösung. B.K. = Bouillonkultur.

| Versuch | Nr. | g | Infektion: Stamm | | Dosis | Behandlung | | | Erfolg $†_1$ = tot 24 Std |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 13 | Modifikat. I | i.per. | $^1/_1$ Millionstel ccm B.K. | . | . | . | $†_1$ |
| | 2 | 12 | Mauspassage | " | $^1/_{100\,000}$ ccm B.K. | . | . | . | $†_2$ |
| | 3 | 16 | vor 3 Tagen | " | $^1/_{100\,000}$ " " | n. 1$^h$ | 1 : 2500 Trypaflavin | s.c. | OhneB $†_3$ |
| | 4 | 15 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | n. 1$^h$ | 1 : 3000 " | " | $†_2$ |
| | 5 | 14 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | n. 1$^h$ | 1 : 4000 " | " | OhneB $†_2$ |
| 2 | 6 | 17 | Modifikat. I | i.per. | $^1/_{100\,000}$ Öse Ag.K. | . | . | . | $†_2$ |
| | 7 | 17 | Mauspassage | " | $^1/_{10\,000}$ " " | . | . | . | $†_1$ |
| | 8 | 15 | vor 18 Tagen | " | $^1/_{10\,000}$ " " | n. 5′ | 1 : 3000 Trypaflavin | s.c. | $†_4$ |
| | 9 | 14,5 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | n. 5′ | 1 : 3000 " | " | Lebt |
| | 10 | 15 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | n. 5′ | 1 : 3000 " | " | " |
| | 11 | 15 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | n. 5′ | 1 : 3000 " | " | " |
| | 12 | 19 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | n. 5′ | 1 : 3000 " | i.ven. | Spärli |
| | 13 | 20 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | n. 5′ | 1 : 4000 " | " | Bacill |
| | 14 | 25 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | $1^1/_2{}^h$ vor der Infekt. | 1 : 2500 " | " | $†_1$ |
| | 15 | 20 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | | 1 : 3000 " | " | |
| 3 | 16 | 21 | Modifikat. III | s.c. | $^1/_1$ Milliardstel ccm B.K. | . | . | . | $†_3$ |
| | 17 | 21 | vor 1 Woche | " | $^1/_{100}$ Millionstel " " | . | . | . | Lebt |
| | 18 | 19 | Taubenpass. | " | $^1/_{100}$ " " " | . | . | . | $†_9$ |
| | 19 | 26 | | " | $^1/_1$ " " " | . | . | . | $†_2$ |
| | 20 | 18 | | " | $^1/_1$ " " " | . | . | . | $†_2$ |
| | 21 | 24 | | " | $^1/_1$ " " " | n. 10′ | 1 : 1000 Nitrat | s.c. | Lebt |
| | 22 | 27 | | " | $^1/_1$ " " " | n. 10′ | 1 : 1000 " | " | $†_2$ |
| | 23 | 25 | | " | $^1/_1$ " " " | n. 10′ | 1 : 1500 " | " | Lebt |
| | 24 | 27 | | " | $^1/_1$ " " " | n. 10′ | 1 : 1500 " | " | $†_2$ |
| | 25 | 20 | | " | $^1/_1$ " " " | n. 10′ | 1 : 3000 " | " | $†_2$ |
| | 26 | 19,5 | | " | $^1/_1$ " " " | n. 10′ | 1 : 3000 " | " | $†_2$ |
| 4 | 27 | 17,5 | Modifikat. III | s.c. | $^1/_{10}$ Millionstel ccm B.K. | . | . | . | $†_{10}$ |
| | 28 | 16,5 | vor 1 Monat | " | $^1/_1$ " " " | . | . | . | $†_1$ |
| | 29 | 15 | Mauspassage | " | $^1/_{100\,000}$ ccm B.K. | . | . | . | $†_1$ |
| | 30 | 15 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | . | . | . | $†_1$ |
| | 31 | 15 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | . | . | . | $†_1$ |
| | 32 | 15 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | . | . | . | $†_1$ |
| | 33 | 15 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | n. 10′ | 1 : 1500 Nitrat | s.c. | $†_1$ |
| | 34 | 19 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | n. 10′ | 1 : 1500 " | " | $†_2$ |
| | 35 | 17,5 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | n. 10′ | 1 : 2000 " | " | $†_2$ |
| | 36 | 17 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | n. 10′ | 1 : 2000 " | " | $†_2$ |
| | 37 | 17,5 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | n. 10′ | 1 : 3000 " | " | $†_1$ |
| | 38 | 17,5 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | n. 10′ | 1 : 3000 " | " | $†_1$ |
| 5 | 39 | 14 | Modifikat. I | i.per. | $^1/_1$ Millionstel Öse Ag.K. | . | . | . | Lebt |
| | 40 | 14 | vor 20 Tagen | " | $^1/_1$ " " " | . | . | . | " |
| | 41 | 14 | Mauspassage | " | $^1/_{100\,000}$ Öse Ag.K. | . | . | . | $†_3$ |
| | 42 | 13 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | . | . | . | $†_4$ |
| | 43 | 18 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | n. 5′ | 1 : 300 Acridinorange | s.c. | $†_2$ |
| | 44 | 18 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | n. 5′ | 1 : 300 " | " | $†_4$ |

*Tabelle I. Versuche an Mäusen mit Hühnercholerainfektion.* (Fortsetzung.)

| Nr. | g | Infektion: Stamm | Infektion | Infektion: Dosis | Behandlung | Behandlung | Behandlung | Erfolg $\dagger_1$ = tot in 24 Std. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 45 | 15 | Modifikat. I | i.per. | $^1/_{100\,000}$ Öse Ag.K. | n. 5′ | 1 : 300 Acridinorange | s.c. | Lebt |
| 46 | 15 | vor 20 Tagen | " | $^1/_{100\,000}$ " " | n. $2^h$ | 1 : 300 " | " | " |
| 47 | 21 | Mauspassage | " | $^1/_{100\,000}$ " " | n. $2^h$ | 1 : 300 " | " | " |
| 48 | 16 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | n. $2^h$ | 1 : 300 " | " | " |
| 49 | 15 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | n. 5′ | 1 : 300 Chinolingelb | " | " |
| 50 | 19 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | n. 5′ | 1 : 300 " | " | " |
| 51 | 15 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | n. 5′ | 1 : 300 " | " | " |
| 52 | 17 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | n. $2^h$ | 1 : 300 " | " | $\dagger_2$ |
| 53 | 15 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | n. $2^h$ | 1 : 300 " | " | Lebt |
| 54 | 18 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | n. $2^h$ | 1 : 300 " | " | " |
| 55 | · | Modifikat. III 3 Mon. keine | s.c. | $^1/_1$ Millionstel ccm B.K. | · | · | · | Ohne Bac. $\dagger_{11}$ |
| 56 | 20 | Tierpassage | " | $^1/_{100\,000}$ ccm B.K. | · | · | · | $\dagger_2$ |
| 57 | 21 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | · | · | · | $\dagger_2$ |
| 58 | 21 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | · | · | · | $\dagger_1$ |
| 59 | 22 | | " | $^1/_{10\,000}$ " " | n. 5′ | 1 : 200 Chinolingelb | s.c. | $\dagger_2$ |
| 60 | 21 | | " | · | n. 5′ | 1 : 200 " | " | $\dagger_2$ |
| 61 | 22 | | " | · | n. 60′ | 1 : 200 " | " | $\dagger_1$ |
| 62 | 20 | | " | · | n. 60′ | 1 : 200 " | " | $\dagger_2$ |
| 63 | 16 | | " | Nicht infiziert | · | 1 : 200 " | " | Lebt |
| 64 | 10 | Modifikat. I | i.per. | $^1/_{10}$ Millionstel ccm B.K. | · | · | · | $\dagger_1$ |
| 65 | 13 | vor 4 Tagen | " | $^1/_{10}$ " " " | · | · | · | $\dagger_1$ |
| 66 | 13 | Mauspassage | " | $^1/_1$ " " " | · | · | · | $\dagger_1$ |
| 67 | 14 | | " | $^1/_1$ " " " | sofort und 1× täglich | 1 : 4000 Trypaflavin | s.c. | $\dagger_1$ |
| 68 | 15 | | " | $^1/_1$ " " " | | 1 : 4000 " | " | $\dagger_1$ |
| 69 | 16 | | " | $^1/_1$ " " " | | 1 : 4000 " | " | $\dagger_2$ |
| 70 | 14 | | " | $^1/_1$ " " " | | 1 : 6000 " | " | $\dagger_3$ |
| 71 | 15 | | " | $^1/_1$ " " " | | 1 : 6000 " | " | $\dagger_3$ |
| 72 | 15 | | " | $^1/_1$ " " " | | 1 : 6000 " | " | $\dagger_2$ |
| 73 | 11 | | " | Nicht infiziert | · | 1 : 4000 " | " | $\dagger_3$ |
| 74 | 15 | | " | " " | · | 1 : 4000 " | " | Lebt |
| 75 | 17 | Modifikat. I vor 3 Wochen Mauspassage | i.per. | $^1/_1$ Millionstel Öse Ag.K. | · | · | · | $\dagger_1$ Reichl. Hühner-chol. Keine Pneum. |
| 76 | 14 | | " | $^1/_{100\,000}$ Öse Ag.K. | · | · | · | Lebt |
| 77 | 19 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | sofort und 1× täglich | 1 : 4000 Trypaflavin | s.c. | |
| 78 | 17 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | | 1 : 5000 " | " | $\dagger_1$ wie Nr. 75 |
| 79 | 17 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | | 1 : 8000 " | " | |
| 80 | 22 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | | 1 : 10000 " | " | |
| 81 | 20 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | | 1 : 4000 " in Öl | " | $\dagger_3$ Ohne Hühner-chol. Reichlich Pneum. |
| 82 | 17 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | 3 Tage lang behandelt | 1 : 5000 " " " | " | Ohne Bakterien $\dagger_7$ |
| 83 | 17 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | | 1 : 8000 " " " | " | $\dagger_7$ wie Nr. 81 |
| 84 | 17 | | " | $^1/_{100\,000}$ " " | | 1 : 10000 " " " | " | $\dagger_3$ wie Nr. 81 |

Von Bedeutung erscheint der Sektionsbefund bei den nach 30′ nach der i. ven. Einspritzung und den am nächsten Tage gestorbenen Tieren. Während die ersteren die schon von *Browning* erwähnte intensive Färbung der Muskeln zeigten, die die Muskulatur wie aus durchsichtigem Wachs geformt erscheinen läßt, war an den am nächsten Tage gestorbenen Mäusen nichts mehr davon zu sehen, nur Darm und Blase waren deutlich durch ihren gelb fluorescierenden Inhalt gefärbt; Maus 14 ließ noch eine geringe gelbliche Färbung der Muskeln erkennen.

Die Versuche 3 und 4 zeigen die Abhängigkeit des therapeutischen Effektes der subcutanen Behandlung mit Nitrat von der Schwere der Infektion. Dabei sind die verwendeten Bacillen beide Male von etwa der gleichen Virulenz, nur wurde ein verschieden großer Multiplum der tödlichen Dosis angewendet. In Versuch 4 wird bei Infektion mit der 1000fach tödlichen Dosis nur bei 3 Mäusen (Nr. 34—36) eine geringe Verzögerung bewirkt, während im anderen Versuch 2 Tiere (Nr. 21 und 23) gerettet werden. Da die niedrigste Konzentration 1 : 3000 bei beiden Versuchen unwirksam blieb, so finden wir eine deutliche Abstufung des Erfolges nach der Konzentration des Mittels, wie es bei Anwendung eines Desinfiziens a priori vorausgesetzt werden muß.

Eine Abhängigkeit des therapeutischen Erfolges von der Schwere der Infektion zeigt sich auch in den beiden folgenden Versuchen 5 und 6, wo Acridinorange und Chinolingelb angewendet wurden. Während bei Infektion mit kleiner Dosis 5 Tiere von 6 durch Chinolingelb gerettet werden (Nr. 49—51 und 53 und 54), erzielt dasselbe Präparat in Versuch 6 gar keinen Erfolg. In Versuch 5 wurden auch 2 Stunden nach der Infektion durch Acridinorange alle 3, durch Chinolingelb 2 von 3 Mäusen gerettet. Hieraus ist aber nicht auf eine Überlegenheit dieser Präparate gegenüber den 3,6-Diaminoacridinverbindungen zu schließen, sondern als Erklärung der Erfolge ist wohl nur die sehr geringe Virulenz der in diesem Versuche benutzten Bacillen heranzuziehen.

Leider stehen uns außer der ersten Versuchsreihe (Maus 1—5) keine weiteren Versuche mit 3,6-Diaminoacridinverbindungen zu Gebote, in denen die Wirkung einer Therapie 1 Stunde und später nach der Infektion bei *mäßiger Virulenz* versucht wurde; bei der höchst virulenten Modifikation II unseres Stammes konnte nach 1 und 4 Stunden nur gelegentlich eine Verzögerung des Todes erreicht werden. Etwas besser waren die Erfolge bei Behandlung dieser schweren Infektion (Modifikation II) mit Nitrat 5′ nach der Infektion. Während 3 mit Acridinorange 1 : 300 s. c. und 2 mit 1 : 300 Chinolingelb s. c. behandelte Mäuse mit den Kontrollen starben, wurden von 18 mit Nitrat i. per. nach 5′ behandelten Tieren 7 beeinflußt, 3 starben, um 1 Tag verzögert, an der Infektion und 4 innerhalb von 24 Stunden ohne Bacillen, der größere Teil der beeinflußten Tiere entfiel dabei auf die Versuche, in denen die Kultur subcutan und das Mittel i. per. gegeben war. (Siehe Tab. II.)

In Versuch 7 wurde eine mehrmalige Behandlung mit Trypaflavin vorgenommen. Es ist in diesem Versuch die kleinste tödliche Dosis nicht festgestellt; jedenfalls war die Infektion nicht schwer. Hier zeigt die kleine Dosis 1 : 6000 eine ganz deutliche, die größere 1 : 4000, die wie die Giftkontrollen (Nr. 73, 74) beweisen, schon an der Grenze des Ertragenen steht, höchstens eine ganz geringe lebensverlängernde Wirkung.

Ein merkwürdiges Ergebnis hat der Versuch 8, wo der Ersparnis halber in vorhergehenden Versuchen (vor 2—4 Wochen) mit Pneumokokken infizierte und (zum Teil nach Behandlung mit Acridinpräparaten) überlebende Mäuse benutzt wurden. Während die mit wässeriger Trypaflavinlösung behandelten Mäuse sämtlich an Hühnercholerabacillen starben, wird bei allen mit der öligen Lösung behandelten Tieren die Infektion verhindert, letztere starben aber fast alle (bis auf Maus 82, bei der keine Todesursache festgestellt wurde) mit reichlichen Pneumo-



kokken. Von den Kontrollen stirbt nur eine an Hühnercholerainfektion, die andere überlebt. Es muß hieraus geschlossen werden, daß die Pneumokokken im Stadium der latenten Infektion im Organismus fortgelebt haben und durch einen Reiz, den wir wohl mit Recht in dem Effectus contrarius suchen, wieder zur Virulenz angefacht worden sind. Ob die Pneumokokken aus den Mäusen (81, 83 und 84) arzneifest waren, wurde leider nicht untersucht. Hier muß noch darauf hingewiesen werden, daß in dem Versuch 5 die Mäuse Nr. 50 und 51, die durch 1 : 300 Chinolingelb anscheinend geheilt waren, ebenfalls eine latente Infektion behalten hatten, denn als sie nach 3 Wochen mit Micrococcus melitensis (1 Öse i. per.) infiziert wurden, starben sie nach 2 Tagen mit sehr reichlichen Hühnercholerabacillen, ohne daß Micrococcus melitensis nachgewiesen werden konnte, mit einer starken serösen Pleuritis, wie wir sie oft bei chronischem Verlauf nach Infektionen, die an der Grenze der Wirksamkeit stehen, beobachtet haben, während akut sterbende Mäuse keine solchen lokalen Symptome zeigten. Da wir später, besonders bei lokaler Wundbehandlung mit Trypaflavin und Vuzin, siehe *Reinhard*, noch analoge Fälle erlebten, so ist vielleicht die Abtötung der Bacillen durch chemotherapeutische Mittel häufiger, als man annimmt, eine unvollkommene, und es können in ihrer Virulenz geschwächte Individuen zurückbleiben, die, sei es durch Giftreizung, sei es infolge einer Schwächung des Organismus, wieder gefährlich werden können.

In einigen weiteren hier nicht mitgeteilten Versuchen, in denen die Infektion nicht ausreichte, um alle Kontrollen zu töten, starben von 2 mit 1 : 1000 und von 4 mit 1 : 2000 Nitrat behandelten Mäusen je eine an der Infektion, gleichzeitig blieben je 2 mit 1 : 1500 und 1 : 3000 behandelte Mäuse am Leben. Hiernach ist bei Nitrat der Effectus contrarius keine große Gefahr bei der Dosierung, dagegen tritt die wechselnde Toleranz der Mäuse für höhere Dosen des Präparates auch bei schwacher Infektion der Mäuse hervor. Einen Effectus contrarius zeigte auch Acridinorange, das, in Dosen 1 : 200 und 1 : 300 subcutan appliziert, Mäuse an der Infektion sterben ließ, während die Kontrolle am Leben blieb.

Ich gebe nun zwei Übersichtstabellen über *sämtliche* Versuche, die bei intraperitonealer (Tab. II) und subcutaner (Tab. III) Behandlung 5 Minuten nach der Injektion mit Hühnercholera angestellt worden sind, weggelassen wurden nur Versuche mit ungenügender Infektion (Überleben einiger Kontrollen) und solche mit mehrfacher Behandlung.

Wir sehen, daß im ganzen die Versuche mit intraperitonealer Behandlung besser ausgefallen sind, allerdings beziehen sie sich zum Teil auf schwächere Infektion. Wo sowohl die Infektion wie die Behandlung i. per. geschah, ist auch eine unmittelbare örtliche Einwirkung, d. h. eine Abtötung in der geschlossenen Bauchhöhle anzunehmen, wenn dieselbe auch bei diesen Septicämieerregern lange keine so ausschlaggebende Rolle spielt wie bei den Choleraversuchen von *Baumgarten*. So sind Sulfat und Nitrat in ganz kleinen Dosen bei intraperitonealer Injektion wirksam, während die Wirksamkeit bei subcutaner Behandlung nur bei großen Dosen eintrat. Die Versuche mit Nitrat in Tabelle III sind zwar alle erst nach 10 und 15 Minuten angestellt und betreffen die ziemlich virulente Modifikation III unseres Stammes. Immerhin läßt sich ein Zusammenhang der Wirksamkeit kleiner Dosen mit der Art der Applikation wohl nicht von der Hand



*Tabelle II. Hühnercholeraversuche an Mäusen.*

Behandlung intraperitoneal 5′ nach der Infektion  Infektion außer im Versuch in der untersten Spalte stets intraperitoneal.

| | Tod ohne oder mit sehr spärlichen Bacillen | *Beeinflussung ohne Berücksichtigung der Vergiftung.* 4:0 (1) bedeutet: von 4 Tieren keines gerettet, 1 stirbt später als die Kontrolle. Ob es an Gift gestorben ist, lehrt die vorhergehende Rubrik. | | | | | | | | | | | Im ganzen beeinflußte u. unbeeinflußte | Infektion |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1:100 | 1:200 | 1:300 | 1:500 | 1:1000 | 1:1500 | 1:2000 | 1:2500 | 1:3000 | 1:4000 | 1:5000 | | |
| Trypaflav. i. Wasser | 1 mit 1:3000 behandelt †₂<br>1 „ 1:4000 „ †₃ | . | . | . | . | . | . | . | 1:1 | 1:0 (1) | 1:0 (1) | . | 3 + 0 | Modif. I |
| „ in Öl | . | . | . | . | . | . | . | . | 1:0 | 1:0 | 1:1 | . | 1 + 2 | i. per. |
| Base in Öl | 1 mit 1:200 behandelt †₂ | . | 1:0 | . | . | 1:1 | . | . | . | . | . | . | 2 + 0 | Desgl. |
| Nitrat in Wasser | 1 „ 1:1000 „ †₃<br>1 „ 1:2000 „ †₄ | . | . | . | . | 1:0 (1) | . | 3:2 | 1:0 (1) | . | 3:2 | 3:2 | 9 + 2 | „ |
| Sulfat „ „ | . | . | . | . | . | 1:1 | . | 3:3 | 1:1 | . | 3:3 | 3:3 | 11 + 0 | „ |
| Aurophosphin 4 G extra in Wasser | 2 mit 1:300 behandelt †₁ | . | . | 2:0 | . | . | . | . | . | . | . | . | 2 + 0 | „ |
| Chrysanilin i. Wasser | 1 „ 1:300 „ †₁ | . | . | 2:0 | . | . | . | . | . | . | . | . | 1 + 1 | „ |
| Tryparosan „ „ | 1 „ 1:500 „ †₃ | . | . | . | 2:0 (1) | . | . | . | . | . | . | . | 1 + 1 | „ |
| Trypanblau „ „ | . | 2:0 (2) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 2 + 0 | „ |
| Trypanrot „ „ | . | . | 2:0 (2) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 2 + 0 | „ |
| Nitrat in Wasser | 3 mit 1:1000 behandelt †₁<br>1 „ 1:2000 „ †₁ | . | . | . | . | 10:0 (2) | 4:0 (1) | 4:0 | . | . | . | . | 7 + 11 | Mod. II teils i. per. teils s.c |

*Tabelle III. Hühnercholeraversuche an Mäusen.*

Behandlung subcutan 5′ nach der Infektion (bei Nitrat 10′ und 15′). Infektion teils intraperitoneal, teils subcutan.

| | Tod ohne oder mit ganz wenig Bacillen | *Beeinflussung ohne Berücksichtigung der Vergiftung.* 8:3 (1) bedeutet: von 8 Tieren 3 gerettet, 1 stirbt später als die Kontrolle. Ob es an Gift gestorben ist, lehrt die vorhergehende Rubrik. | | | | | | | | | | | | | | Im ganzen beeinflußte u. unbeeinflußte | Infektion |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1:200 | 1:300 | 1:600 | 1:900 | 1:1000 | 1:1200 | 1:1500 | 1:2000 | 1:2500 | 1:3000 | 1:4000 | 1:6000 | 1:9000 | 1:10000 | | |
| Trypaflavin | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 4:3 (1) | . | . | . | . | 4 + 0 | Mod. I i. per. |
| Nitrat | . | . | . | . | . | 2:1 | . | 8:3 (1) | 2:0 (2) | . | 4:0 | . | . | . | . | 7 + 9 | Mod. III s.c. |
| Aurorphosphin 4 G extra | 1 mit 1:300 behandelt †₁ | . | 2:0 (1) | . | . | 2:1 (1) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 4 + 0 | Mod. I i. per. |
| Acridinorange | 1 „ 1:300 „ †₁ | . | 13:4 (2) | . | . | 2:0 (2) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 9 + 6 | Mod. I i. per. u. sc. |
| Aurophosphin G extra | . | . | 2:0 | . | . | 2:0 (1) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 1 + 8 | Mod. I i. per. |
| Chrysanilin | . | . | 2:0 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 0 + 2 | Mod. I i. per. |
| Chinolingelb | 2 mit 1:300 behandelt †₁ | 2:0 | 15.5 (4) | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 11 + 6 | Mod. I u. III i. per u. s.c. |
| Acridinorange | . | . | 8:0 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 0 + 3 | Mod. II i. per. |
| Chinolingelb | . | . | 8:0 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | 0 + 3 | Mod. II i. per, |
| Chinolinrot | 1 mit 1:600 behandelt †₁<br>1 „ 1:4000 „ †₂<br>20 „ 1:300—4000 „ †₁ | . | 1:0 | 6:0 (1) | 8:0 | . | 3:0 | 8:0 | . | 2:0 | 2:0 | 2:0 (1) | 1:0 | 1:0 | 1:0 | 25 + 8 | Mod. I u. II i. per u. sc. |
| | | | 14 Tiere sterben ohne Bacillen, 8 mit nur ganz spärl. Bacillen. | | | | | | | | | | Bacillen v. degeneriertem Aussehen, aber reichlich | | | | |

weisen. Jedoch erwies sich das *Nitrat* bei der intraperitonealen Einverleibung auch für den Organismus als bedeutend giftiger; Dosen von 1 : 1000 und 1 : 2500 lassen einige Mäuse um 1 bzw. 2 Tage verzögert mit nur spärlichen Bacillen sterben, so daß wohl die Infektion allein nicht als Todesursache angesehen werden kann. In demselben Versuch erscheint *Sulfat* als ungiftiger: die mit den gleichen Dosen Sulfat behandelten Tiere sterben nicht. *Trypaflavin in Wasser* 1 : 2500 wurde von einer Maus vertragen, während je eine mit 1 : 3000 und 1 : 4000 behandelte Maus mit spärlichen Bacillen um 1 Tag verzögert (3 Tage nach der Infektion) starb. *Trypaflavin in Öl* dagegen rettete in Konzentration 1 : 4000 eine Maus, während 1 : 3000 und 1 : 2500 die betreffenden Tiere ohne Verzögerung in 1—2 Tagen der Infektion erliegen lassen. Also ein Effectus contrarius bei großen Dosen, der schon in der Mitteilung von *Neufeld, Schiemann* und *Baumgarten* erwähnt und als Besonderheit der Acridinpräparate hervorgehoben wurde. Die *Base in Öl* in der Konzentration 1 : 200 tötete dagegen in dem gleichen Versuch mit dem Tiere auch die Bacillen, während sie in Konzentration 1 : 1000, die sich in unseren Pneumokokkenversuchen noch mitunter als giftig erwies, das behandelte Tier rettete.

*Tryparosan* i. per. vermochte in einem anderen Versuche, wie die Tabelle II zeigt, bei einer von 2 Mäusen die Infektion nicht aufzuhalten, das Tier starb wie die Kontrollen in 24 Stunden mit reichlich Bacillen, während das andere Tier erst 3 Tage nach der Infektion ohne Bacillen der Vergiftung erlag. Es ist nach unseren Erfahrungen nicht angängig, wenn ein Tier nach Vergiftung durch ein Antisepticum mit lebenden Bacillen stirbt, daraus allein auf mangelnde desinfizierende Eigenschaften des Präparates im Tierkörper einen Schluß zu ziehen; ein solches Mittel kann trotzdem in kleineren Dosen gegenüber denselben Erregern eine Heilwirkung entfalten. Dabei wirkt offenbar der Organismus in der Regel mit; diese Mitwirkung wird aber durch toxische Dosen gestört. An der Beweiskraft der umgekehrten Schlußfolgerung ist jedoch festzuhalten, nämlich daß ein Präparat, welches ein infiziertes Tier ohne Bacillenbefund tötet zu einem Zeitpunkt, wo die Kontrollen reichlich Bacillen enthalten, im Tierkörper antiseptisch gewirkt hat. *Trypanrot und Trypanblau* erreichen eine deutliche Verzögerung (um 2 Tage) der behandelten Tiere. *Aurophosphin 4 G extra und Chrysanilin* wurden intraperitoneal nur in sehr hoher Konzentration geprüft und zeigten Giftwirkung gegenüber den Bacillen und dem Organismus.

Bei *subcutaner* Anwendung (Tab. III) ist *Aurophosphin 4 G extra* 1 : 300 ebenfalls in einem Falle giftig für die Maus, die dabei sterilisiert wird, in einem anderen Falle stirbt die Maus verzögert an der Infektion, 1 : 1000 dagegen rettet eine Maus und läßt die andere ver-





zögert sterben. Es wurden zu wenig Versuche gemacht, um zu beurteilen, ob die Dosierung des Präparates ebensolche Schwierigkeiten macht, wie die der 3,6-Diaminoacridinverbindungen. *Acridinorange s. c.* rettet nur in der mitunter giftigen Dosis 1 : 300 eine Anzahl Tiere, bei Anwendung der Konzentration 1 : 1000 erreichten wir nur Verzögerung. *Aurophosphin G extra* und Chrysanilin zeigten s. c. in der Dosis 1 : 300 keine Wirkung, ersteres Präparat war nur in der schwächeren Dosis 1 : 1000 von verzögerndem Einfluß. *Chinolingelb s. c.* übt in der hohen Dosis 1 : 200 keinen Einfluß auf die Infektion aus, 1 : 300 aber rettet von 15 Tieren 5, bewirkt bei 2 Tieren Tod mit spärlichen Bacillen und bei 4 Tieren eine Verzögerung des Todes. Der Mißerfolg der größeren Dosis ist durch die höhere Virulenz der zur Infektion benutzten Modifikation III gegenüber der Modifikation I erklärlich. Daß die in der Tabelle getrennt aufgeführten Infektionen mit der noch virulenteren Modifikation II nur ganz unbedeutend durch Nitrat beeinflußt wurden, während Acridinorange und Chinolingelb ohne Wirkung blieben, wurde bereits erwähnt. *Chinolinrot* ist im Gegensatz zu den mit allen anderen Mitteln gemachten Erfahrungen unabhängig in seiner keimvernichtenden Wirkung von einer Mitwirkung des Organismus: alle 22 mit diesem Präparat vergifteten Tiere sterben ohne oder mit nur ganz spärlichen Bacillen. Leider übt es in ungiftigen Dosen keinen nennenswerten Einfluß mehr auf die Infektion aus. Zwar ließen sich degenerative Erscheinungen an den Bacillen nachweisen, die bei den Kontrollen in diesem Versuche fehlten und in dem Auftreten der eingangs erwähnten großen ring- oder blasenförmigen Bildungen anstatt der Bacillen bestanden.

Ziehen wir das Fazit aus den Tierversuchen, so ergab entschieden das Sulfatsalz die besten Erfolge, abgesehen vielleicht von der Base, die zu wenig geprüft wurde. Das Aurophosphin 4 G extra, das allerdings nur in wenigen Versuchen geprüft wurde, ergab besseren Erfolg als Aurophosphin G extra, Chrysanilin ist wohl auch dem Acridinorange vorzuziehen, das nur in einer Konzentration, die mitunter giftig ist, wirkte. Trypanrot, Trypanblau und Tryparosan sind eben noch von erkennbarer Wirkung. Chinolingelb übt eine beachtenswerte parasitotrope Wirkung aus, ohne für den Organismus giftig zu sein. Chinolinrot ist durch die Sicherheit ausgezeichnet, mit der der Tierkörper sterilisiert wird, ist aber sehr giftig. In größerem oder geringerem Grade erwiesen sich also alle geprüften Mittel als parasitotrop.

Vergleichen wir nun an Hand der Tabelle IV, inwieweit die Prüfung der Entwicklungshemmung im Reagensglas einerseits und die Feststellung der Dosis maxima tolerata andererseits Anhaltspunkte für die Wirksamkeit der Präparate in vivo gegeben hätte, so würde die Rechnung insofern nicht irregeführt haben, als die im Reagensglas wirksamen Präparate auch im Tierversuch brauchbar gewesen sind. Dagegen ist das Chinolingelb im Reagensglas völlig unwirksam; die Art



*Tabelle IV. Übersichtstabelle.*
*Wirkung der untersuchten Substanzen in vitro und in vivo auf Hühnercholerabacillen.*

| | Wirksamkeit in vitro (Aufhebung der Entwicklung in Bouillon) | Wirksam in vivo? | Dosis maxima tolerata pro 1 Maus | Dosis minima efficax |
|---|---|---|---|---|
| Trypaflavin . . . . . . | 1 : 2 Million — | + | 1 : 50 000 | 1 : 80 000 |
| Acridinbase . . . . . . | 1 : 300 000 — | + | 1 : 20 000 | 1 : 20 000 |
| Nitrat . . . . . . . . | 1 : 300 000 — | + | 1 : 20 000 | 1 : 100 000 |
| Sulfat . . . . . . . . | 1 : 300 000 — | + | 1 : 10 000 | 1 : 100 000 |
| Aurophosphin 4 G extra . | 1 : 100 000 — | + | 1 : 6 000 | 1 : 20 000 |
| Acridinorange . . . . . | 1 : 10 000 — (25 000 ±) | + | 1 : 6 000 | 1 : 20 000 |
| Aurophosphin G extra . . | 1 : 10 000 — | + | 1 : 6 000 | 1 : 20 000 |
| Chrysanilin . . . . . . | 1 : 10 000 — | (+) | 1 : 10 000 | 1 : 6 000 |
| Tryparosan . . . . . . | 1 : 10 000 — | ± | 1 : 10 000 | 1 : 10 000 |
| Trypanblau . . . . . . | 1 : 10 000 + | ± | 1 : 2 000 | 1 : 2 000 |
| Trypanrot . . . . . . . | 1 : 10 000 + | ± | 1 : 4 000 | 1 : 4 000 |
| Chinolingelb . . . . . . | 1 : 100 — | + | 1 : 2 000 (oder mehr) | 1 : 6 000 |
| Chinolinrot . . . . . . | 1 : 25 000 — | (+) | 1 : 100 000 | 1 : 80 000 |

In der Spalte „Wirksamkeit in vitro" bedeutet: + Wachstum, — Aufhebung der Entwicklung; in der Spalte „Wirksamkeit in vivo" bedeutet: + mit der betreffenden Substanz wurden Tiere gerettet, ± es wurde nur eine Verzögerung des Todes erzielt, (+) es wurde nur Tod ohne Bacillen erzielt.

seiner Wirkung im Tierkörper bleibt noch aufzuklären. Auch bei Acridinorange ist die Wirkung im Tierkörper besser, als nach dem Reagensglasversuch zu erwarten war.

*Verbleib des Trypaflavin in der Blutbahn.*

Nun haben wir, ähnlich wie es *Roos*, *Wright*, *Böcker* und neuerdings mit verfeinerter Methode *Schnabel* bei anderen chemotherapeutischen Substanzen getan haben, versucht festzustellen, wie rasch die Konzentrationen, welche dem Blut durch Injektion von Trypaflavin erteilt werden, absinken. In Tabelle V und VI finden sich die Ergebnisse unserer Untersuchungen. Die Versuchsanordnung geht aus Tabelle VI hervor, wo neben Trypaflavin noch das Sulfat und Nitrat in je einem Versuch geprüft wurde. Es wurde von dem behandelten Tier (Kaninchen) vor der Behandlung und zu bestimmten Zeiten nach der Behandlung Blut entnommen und zunächst aus dem Serum der ersten Probe (vor der Behandlung) ein künstliches Trypaflavinserumgemisch von bestimmtem Gehalt hergestellt. Durch Verdünnung dieses Serums und der nach der Behandlung gewonnenen Proben in abgestuften Reihen mit Bouillon und Feststellung, bei welcher Verdünnung Entwicklungsaufhebung von Hühnercholerabacillen bzw. Fluoreszenz die Anwesenheit des Farbstoffes eben noch als vorhanden erwies, konnte





*Tabelle V. Nachweis des Trypaflavin in der Blutbahn.*

| Intravenös injiziert | pro 1 kg Gewicht Trypaflavin | Anfangskonzentration (berechnet) | Entnahme nach | Zahl der Untersuchungen | Davon sind negativ | Davon sind positiv | Nachweisbare Konzentration | Bruchteil der Anfangskonzentration |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Meerschwein | 1 ccm 1:100 | 1: 7 000 | 15′ | 1 | · | 1 | 1 × 1:2 Million. | 1:30 |
| „ | 1 „ 1:100 | 1: 7 000 | 20′ | 1 | · | 1 | 1 × 1:4 „ | 1:600 |
| „ | 1 „ 1:100 | 1: 7 000 | 30′ | 2 | · | 2 | 2 × 1:2 „ | 1:300 |
| „ | 1 „ 1:100 | 1: 7 000 | 40′ | 1 | 1 | · | · | · |
| „ | 1 „ 1:100 | 1: 7 000 | 60′ | 1 | 1 | · | · | · |
| Kaninchen | 1 „ 1:100 | 1: 7 000 | 15′ | 1 | · | 1 | 1 × 1:800 000 | 1:100 |
| „ | 1 „ 1:150 | 1:10 000 | 30′ | 1 | · | 1 | 1 × 1:2 Million. | 1:200 |
| „ | 1 „ 1:100 | 1: 7 000 | 60′ | 2 | 1 | 1 | 1 × 1:2 „ | 1:300 |
| „ | 1 „ 1:150 | 1:10 000 | 120′ | 1 | 1 | · | · | · |
| „ | 1 „ 1:100 | 1: 7 000 | 120′ | 1 | 1 | · | · | · |
| | pro Person | | | | | | | |
| Mensch | 10 ccm 1:200 | 1:93 000 | 60′ | 5 | 3 | 2 | 1 1:800 000 | 1: 9 |
| | | | | | | | 1 × 1:4 Million. | 1:40 |
| | | | | | | | 1 × 1:750 000 | 1:16 |
| „ | 20 „ 1:200 | 1:47 000 | 60′ | 7 | 2 | 5 | 2 1:2 Million. | 1:43 |
| | | | | | | | 2 × 1:4 „ | 1:90 |
| „ | 20 „ 1:200 | 1:47 000 | 120′ | 2 | 1 | 1 | 1 × 1:4 „ | 1:90 |

die in der unverdünnten Probe befindliche Konzentration gemessen werden. Bei den Entwicklungshemmungsversuchen wurden alle von einem Tier zu verschiedenen Zeiten entnommenen Blutproben gleichzeitig gegenüber derselben Einsaat angesetzt, um ein zuverlässiges Resultat zu sichern. Besonders ist das notwendig bei Menschensera, die nach *Schou* wechselnde bactericide Eigenschaften für Hühnercholera besitzen. Bei unsern Versuchen schwankte die Grenze der Entwicklungshemmung in verschiedenen Proben von Menschenserum zwischen 1 : 750 000 und 1 : 5 000 000.

In der Tabelle VI ergab sich eine Übereinstimmung der Fluorescenzprobe mit der Prüfung der Entwicklungshemmung in den künstlichen Gemischen, einmal war auch Fluorescenz in dem Serum eines behandelten Tieres nachweisbar. Ersichtlich erfolgt ein außerordentlich schnelles Absinken der Trypaflavinkonzentration, die beim Kaninchen in 15 Minuten bereits von einer Konzentration 1 : 7000 (bei Annahme einer Blutmenge = $^1/_{15}$ *Körpergewicht*) auf 1 : 800 000 absank, während Nitrat nach Einspritzung von ebenfalls 1 : 7000 nach 20 Minuten noch in der Konzentration von 1 : 200 000 nachweisbar war.

Die meisten Versuche der Tabelle V beziehen sich auf Menschensera, wobei sich erwies, daß 1 Stunde nach der Injektion in der Mehrzahl der Fälle (5 mal unter 7 Fällen) noch geringe Konzentrationen (1 : 750 000 bis 1,4 Million) bei einer Anfangskonzentration 1 : 47 000



*Tabelle VI. Bestimmung der Abnahme der Konzentration nach Injection von Trypaflavin etc. am Blut bei Kaninchen.* Blutentnahme durch Herzpunktion, + bedeutet positives Ergebnis der Prüfung auf Fluorescenz bezw. Hemmung des Wachstums von Hühnercholerabacillen. Einsaat 1 Öse einer Aufschwemmung von 1 Öse Agarkultur in 1 ccm Kochsalzbacillenverdünnung in 0,2 ccm Serum.

| | Untersuchung mit dem Serum des Tieres in vitro hergestellter Trypaflavinverdünnungen. | | | Durch intravenöse Injektion im Blut entstandene Konzentration. | | Untersuchung der in vivo entstandenen Trypaflavinkonzentration. | | | | Bruchteil der Anfangskonzentration |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Verdünnung 1: | Fluorescenz. | Hemmung. | injiz. Menge auf 1 kg Tiergewicht g | berechnete Konzentration im Blut 1: | bei Entnahme nach: | Verdünnung | Fluorescenz | Hemmung | |
| 1. Trypaflavin (neutral) | 500 000 | + | + | 1/150 | 10 000 | 30′ | u. v. | − | + | 1/200 |
| | 1 Million | − | · | | | | 1 : 2 | − | − | |
| | 2 Million | − | + | | | | | | | |
| 2. desgl. | 400 000 | + | + | 1/100 | 7 000 | 15′ | u. v. | ? | + | 1/100 |
| | 800 000 | + | + | | | | 1 : 2 | − | − | |
| | 1 600 000 | − | − | | | | | | | |
| 3. Nitrat. | 200 000 | + | + | 1/100 | 7 000 | 20′ | u. v. | + | + | 1/30 |
| | 400 000 | | − | | | | 1 : 2 | + | − | |
| | 800 000 | − | − | | | | 1 : 4 | | − | |
| 4. Sulfat | 200 000 | + | + | 1/100 | 7 000 | 10′ | u. v. | − | − | ? |
| | 400 000 | − | − | | | | 1 : 2 | − | − | |

im Serum enthalten waren, bei Injektion der halb so großen Trypaflavinmenge war nur in 2 von 5 Fällen noch Trypaflavin nachweisbar. Die Verhältnisse liegen also beim Menschen etwas günstiger als beim Kaninchen und Meerschweinchen: auch 2 Stunden nach der Injektion war einmal Trypaflavin nachweisbar, beim Kaninchen nach Injektion einer viel größeren Menge nach 2 Stunden nichts mehr, nach 70 Minuten einmal. Wie Sektionen intravenös behandelter Tiere ergaben (siehe später), wird Trypaflavin und Nitrat in der Muskulatur gespeichert, bereits kurz nach der Injektion ist dieselbe intensiv gefärbt. Es ist anzunehmen, daß von hier aus sekundär wieder der Farbstoff ins Blut gelangt, denn, abgesehen von einem Fall, wo das Trypaflavin direkt in die Muskulatur injiziert worden war, war nach 24 Stunden post injectionem die Muskulatur stets ungefärbt. Auch andere Organe und Zellen könnten für eine zeitweise Speicherung des Farbstoffes in Betracht kommen.

Ein ähnliches rasches Absinken der Optochinkonzentration offenbart sich deutlich in den Kurven der *Schnabel*schen Arbeit, hier kommen nach Untersuchungen von *Morgenroth*, *Böcker*, *Schilling* und *Böcker* sowie *Schnabel* die Erythrocyten, vielleicht auch andere Zellen als speicherungsfähige Teile des Organismus in Betracht.

Im Mäusekörper entschwindet das Trypaflavin nach weiteren Untersuchungen besonders schnell aus der Blutbahn, denn bei Untersuchung von Mäuseserum, das kurz nach der intravenösen Injektion von 1 : 4000



Trypaflavin gewonnen worden war, fand sich nie entwicklungshemmende Fähigkeit gegenüber Hühnercholerabacillen; spätere Entnahmen, die vielleicht ein Wiederansteigen zeigen könnten, wurden bisher nicht untersucht.

Diese Versuche mit Mäuseserum wurden mit Hilfe einer Mikromethode ausgeführt, bei der mit einer 100teiligen 0.1 ccm-Pipette das Serum abgestuft verdünnt wurde und die Entwicklungshemmungsversuche im hängenden Tropfen nach *Behrings* Vorgang angestellt wurden.

Unsere Ergebnisse stehen in gewissem Gegensatz zu den Mitteilungen, die *Browning* und *Gulbranson* über ähnliche Versuche gemacht haben. Diese Autoren benutzten die entwicklungshemmenden Eigenschaften des 3,6 Diaminoacridinsulfates gegenüber Colibacillen und Staphylokokken als Maßstab. Nach ihren Versuchen werden Staphylokokken in inaktivem Kaninchenserum bis 1 : 200 000, Colibacillen bis 1 : 100 000 gehemmt. Bei einem Kaninchen, dem allerdings die sehr hohe Anfangskonzentration im Blute von etwa 1 : 1000 (0,13 g auf 1950 g Tier) erteilt war, fanden sie noch nach 5′ eine Hemmung der Staphylokokken in 50% Serum, der Colibacillen in 25% Serum, nach 15—25′ Hemmung der Staphylokokken in unverdünntem Serum, von Colibacillen in 50% Serum, nach $2^1/_2$ Stunden keine Hemmung von Staphylokokken, dagegen Hemmung von Colibacillen in unverdünntem Serum. Hiernach mußte noch nach $2^1/_2$ Stunden eine Konzentration 1 : 100 000 in dem Serum vorhanden gewesen sein, wenn man den früheren Versuch mit Colibacillen zugrunde legt, dagegen wäre sie geringer als 1 : 200 000, wenn der Staphylokokkenversuch zugrunde gelegt wird.

Da sich Kaninchenserum beiden Bakterienarten, besonders aber den Colibacillen gegenüber, an sich hoch bactericid verhält und *Browning* eine recht kleine Einsaat benutzte, so ist es nicht anzunehmen, daß die Entwicklungshemmung auf der Anwesenheit von Acridin beruhte. Allerdings wurde in dem vor der Einspritzung entnommenen Kontrollserum die gleiche Einsaat nicht abgetötet, es können aber Änderungen in der Bactericidie des Serums eingetreten sein, wie sie ja z. B. durch Erhöhung der Alkalescenz des Blutes auch sonst erreicht werden können. Besonders spricht für eine Änderung der Bactericidie des Serums an sich der Umstand, daß entgegen dem Verhalten in den künstlichen Mischungen hier Colibacillen durchweg besser beeinflußt werden als Staphylokokken. Aus diesem Grunde sind unsere Versuche mit Menschenserum vielleicht auch nicht ganz beweisend, da ja auch hier, wie erwähnt, die natürliche Bactericidie des Serums gegenüber Hühnercholerabacillen zum Ausdruck kommt.

Wir müssen also nach unseren bisherigen Untersuchungen annehmen, daß das Trypaflavin schnell aus dem Blut verschwindet, besonders bei der Maus. Trotzdem ist gerade bei Mäusen Trypaflavin und Nitrat von guter Wirkung gegenüber der Hühnercholerainfektion gewesen. Daß es sich in der Hauptsache um eine direkte, abtötende oder entwicklungshemmende Wirkung der Mittel handelt, ist wohl nicht zu bezweifeln. Nun ist aber schon aus Trypanosomenversuchen bekannt, daß Trypaflavin eine virulenzabschwächende Wirkung haben kann. Auch bei Bakterien kommt ein solcher Einfluß bei bactericiden Stoffen in Betracht; so hat *Morgenroth* bei dem Isoamylhydrocuprein (Eucupin) eine solche Wirkung gegenüber Streptokokkeninfektion wahrscheinlich gemacht. Nach *Morgenroth* und *Tugendreich* erfolgte in Ascitesbouillonverdünnungen von 1 : 40 000 dieser Substanz Abtötung, in solchen von



1 : 80 000 bereits ungehemmtes Wachstum von Streptokokken; injizierten die Autoren aber 0,5 ccm einer 24stündigen Kultur aus der Bouillonverdünnung 1 : 80 000 oder auch 1 : 160 000 einer Maus, so ging die Infektion nicht an, erst durch dieselbe Menge der Kultur aus der Verdünnung 1 : 320 000 konnte der Tod der Tiere an der Infektion bewirkt werden.

Daneben ist ein Ictus immunisatorius nicht auszuschließen, der von *Ehrlich* zunächst für die Therapie bei Trypanosomeninfektionen, wo die Tiere bereits einige Tage krank sind, ehe sie zur Behandlung kommen, also bereits reichlich Antigen im Körper vorhanden ist, in Anspruch genommen wurde. Ich möchte aber auch bei Behandlung kurze Zeit nach der Infektion den durch Abtötung einer Anzahl Bakterien erzielten Reiz als Ictus immunisatorius auffassen.

### *Versuche an Mäusen bei Infektion mit Friedländerbacillen.*

Ob außer dem Ictus immunisatorius noch direkte ganz allgemein die Vitalität des Organismus erhöhende Reize einem Chemotherapeuticum zugeschrieben werden müssen, ist schwer zu entscheiden. Neuerdings wird ja von mehreren Autoren, namentlich *Starkenstein* (vgl. *Sachs*' Ausführungen über eine „anaphylaktoide" Wirkung der Chemo-

*Tabelle VII. Versuche an Mäusen mit Infektion durch Friedländerbacillen.*

| Versuch | Nr. | g | Infektion intraperitoneal: Stamm | Infektion intraperitoneal: Dosis | Behandlung intraperitoneal | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 17 | 4. Passage vor 2 Tagen | 1/1 Millionstel ccm B.K. | . | . | †3 |
| | 2 | 22 | | 1/100 000 ccm B.K. | . | . | †2 |
| | 3 | 18 | | 1/10 000 " " | . | . | †2 |
| | 4 | 21 | | 1/10 000 " " | . | . | †2 |
| | 5 | 25 | | 1/10 000 " " | n. 5′ | 1 : 4000 Sublimat | ohne Bac. *) |
| | 6 | 19 | | 1/10 000 " " | n. 5′ | 1 : 4000 " | †1 |
| | 7 | 19 | | 1/10 000 " " | n. 5′ | 1 : 8000 " | †2 |
| | 8 | 20 | | 1/10 000 " " | n. 5′ | 1 : 8000 " | †3 |
| | 9 | 19 | | 1/10 000 " " | n. 5′ | 1 : 3000 Trypaflavin | †2 |
| | 10 | 18 | | 1/10 000 " " | n. 5′ | 1 : 3000 " | †3 |
| | 11 | 19 | | 1/10 000 " " | n. 5′ | 1 : 6000 " | †1 |
| | 12 | 18,5 | | 1/10 000 " " | n. 5′ | 1 : 6000 " | †2 |
| 2 | 13 | 19 | 5. Passage vor 4 Tagen | 1/10 Millionstel ccm B.K. | . | . | lebt |
| | 14 | 14 | | 1/1 " " " | . | . | †2 |
| | 15 | 18 | | 1/100 000 ccm B.K. | . | . | †2 |
| | 16 | 16 | | 1/100 000 " " | . | . | †1 |
| | 17 | 18 | | 1/100 000 " " | n. 15′ | 1 : 5000 Sublimat | lebt †8 (interkur.) |
| | 18 | 12 | | 1/106 000 " " | n. 15′ | 1 : 5000 " | †3 |
| | 19 | 13 | | 1/100 000 " " | n. 15′ | 1 : 6000 " | †3 |
| | 20 | 19 | | 1/100 000 " " | n. 15′ | 1 : 6000 " | †3 |
| | 21 | 17 | | 1/100 000 " " | n. 15′ | 1 : 3000 Trypaflavin | lebt |
| | 22 | 17 | | 1/100 000 " " | n. 15′ | 1 : 3000 " | †3 |
| | 23 | 13 | | 1/100 000 " " | n. 15′ | 6 : 4000 " | †2 |
| | 24 | 19 | | 1/100 000 " " | n. 15′ | 1 : 4000 " | †2 |

*) Nr. 5 u. 6 enthielten mikroskopisch keine Friedländerbacillen, bei Aussaat von je 1 Öse wurden jedoch aus Blut, Peritoneum und Milz je 10–20 Kolonien gezüchtet. Maus 17 erwies sich auch kulturell steril.

therapeutika) eine „omnicellulare" Wirkung für möglich gehalten und besonders von *Bier* und seinen Schülern auf Grund der *Virchow*schen Reizlehre den unspezifischen Entzündungsvorgängen eine große Rolle zugewiesen. Solche Ansichten sind natürlich schwer unmittelbar zu widerlegen. Am ehesten müßte das gelingen, wenn man nachweisen könnte, daß die betreffende Substanz nur gegenüber solchen Bakterien wirksam ist, die sie auch im Reagensglas beeinflußt. Für Salvarsan und Optochin ist seinerzeit dieser Beweis von *Neufeld* und *Schiemann* geführt worden. Trypaflavin ist nun gegenüber den meisten Bakterien ein stark wirksames Antisepticum. Gegenüber der Typhuscoli- und der Friedländergruppe ist es indessen verhältnismäßig wenig wirksam. Ich habe daher 2 Versuche angestellt, in denen der therapeutische Erfolg der Trypaflavin- und Sublimatbehandlung gegenüber Friedländerbacillen untersucht wurde (Tab. VII).

Es ergibt sich, daß in beiden Versuchen 1 : 3000 Trypaflavin i. per., am Ort der Infektion gegeben, nicht ohne Wirkung war, in dem einen Versuch überlebte sogar ein Tier. Dabei war in diesem Versuch 1 ccm 1 : 3000 Trypaflavin tatsächlich injiziert worden, während in dem ersten Versuch 0,2 ccm der 5fach stärkeren Konzentration injiziert worden war. Nach Reagensglasversuchen ist in Bouillonverdünnungen von 1 : 3000 Trypaflavin die Entwicklung von Friedländerbacillen aufgehoben, während in 1 : 5000 und 1 : 10 000 ungehemmtes Wachstum erfolgte. Ferner war in der Verdünnung 1 : 5000, obgleich das Wachstum ungehemmt erschien, doch die Mehrzahl der Bakterien gefärbt, und auch in der Verdünnung 1 : 10 000 war noch eine erhebliche Anzahl gefärbter Bacillen zu sehen. Ob diese als abgestorbene oder vital gefärbte Bakterien zu deuten sind, jedenfalls zeigt sich, daß das Mittel in dieser Konzentration noch eine direkte Wirkung auf die Bakterien hat. Da es sich in dem zweiten Versuche um eine nicht sehr schwere Infektion handelte, so ist es möglich, daß ein geringer bactericider Effekt schon therapeutische Erfolge zeitigen konnte; außerdem kommt eine Abschwächung der Virulenz in Frage. Eine direkte antiseptische Wirkung kann um so eher angenommen werden, als das Mittel am Orte der Infektion angewandt wurde. Damit würde ferner in Einklang stehen, daß in beiden Versuchen allein 1 : 3000 Trypaflavin wirkte, die niedrigeren Konzentrationen 1 : 4000 und 1 : 6000 wirkungslos blieben, die doch gegenüber einer anderen intraperitonealen Infektion, der Cholera, als wirksam befunden worden waren (siehe *Baumgarten*). Auf Cholera wirkt aber Trypaflavin auch in vitro in viel schwächeren Konzentrationen. *Auch bei Sublimat sehen wir in beiden Versuchen die Wirkung als eine bactericide an.* Im ersten Versuch starben 2 mit 1 : 4000 behandelte Tiere ohne Bacillen, im zweiten Versuch stirbt 1 mit 1 : 5000 behandelte Maus interkurrent



nach 8 Tagen ohne Bacillen, während die mit niedrigeren Dosen von Sublimat behandelten Tiere der Infektion erliegen. Nach diesem Versuch hat somit Trypaflavin in der Bauchhöhle fast so gut wie im Reagensglas gewirkt, während Sublimat, das in vitro bis 1 : 1 000 000 die Entwicklung von Friedländerbacillen in Bouillon aufhob, die bekannte starke Abschwächung erfuhr. Jedoch war im ganzen genommen die Wirkung des Sublimats gegen Friedländerbacillen auch in vivo noch besser als die des Trypaflavin. Dem entsprechen die von mir bereits früher mitgeteilten Wunddesinfektionsversuche.

Hiernach glauben wir, im Gegensatz zu früheren Anschauungen, daß auch Sublimat in geeigneten Fällen im lebenden Körper unmittelbar bactericid wirken kann. Dies spricht wohl, neben anderen Tatsachen, deutlich dafür, auch seine Wirkung bei Spirochäten als unmittelbar auf die Erreger gerichtet anzusehen.

*Versuche mit Hühnercholera an Kaninchen, Meerschweinchen und Hühnern.*

Wie in der Arbeit von *Neufeld* und *Schiemann* mitgeteilt, ist es uns bei einmaliger Injektion von 0,01 Trypaflavin pro 1 kg Kaninchen in die Ohrvene kurze Zeit nach der subcutanen Infektion des Tieres mit Hühnercholerabacillen einmal gelungen, ein Tier zu retten. Weitere Versuche mit intravenöser Behandlung auch bei mehrmals täglich erfolgenden Gaben blieben erfolglos, zum Teil starben mehrmals behandelte Tiere vor den Kontrollen. Bei Meerschweinchen wurde auch bei einmaliger subcutaner Einspritzung einer ziemlich großen Dosis Nitrat ein ungünstiger Effekt erzielt. Es trat ein richtiger Effectus contrarius ein.

Je 3 Meerschweinchen wurden mit $^{1}/_{5}$ ccm und 1 ccm der Bouillonkultur der eingangs erwähnten Modifikation III unserer Hühnercholera infiziert. Je 2 von den 200 g schweren Tieren wurden mit 1 ccm 1 : 300 Nitrat behandelt und je 1 Tier als Kontrolle beobachtet. Die mit der größeren Dosis infizierte Kontrolle trug ein großes Infiltrat davon, das zu einer Phlegmone mit ausgedehntem Haarausfall führte, beide Kontrollen überstanden aber die Erkrankung. Von den behandelten Tieren starben beide mit der größeren Dosis infizierte Tiere in 3—4 Tagen an Hühnercholera.

Die Versuche an Hühnern, die uns besonders wichtig erschienen, weil es sich hier um Infektion mit einem spontan als Krankheitserreger bei diesen Tieren vorkommenden Keim handelt, der im Reagensglas außerordentlich stark durch unser Mittel beeinflußt wird, verliefen leider ebenfalls im wesentlichen negativ. Bei Bewertung dieser Mißerfolge ist aber auf den außerordentlich schnellen Verlauf der Krankheit hinzuweisen. Einmal wurde jedoch eine deutliche Verzögerung um einen ganzen Tag erzielt, während dessen das behandelte Tier auch keine Krankheitserscheinungen zeigte. Es hatte pro 1 kg 5 ccm 1 : 100 Nitrat intravenös erhalten.



Da das Tier 24 Stunden nach der Behandlung noch ganz munter erschien, erhielt es noch einmal 5 ccm 1 : 100 Nitrat, aber dieses Mal intramuskulär. Bei der Sektion erwies sich die Brustmuskulatur der injizierten Seite knallgelb, die der anderen normal gefärbt. Hieraus geht hervor, daß das Muskelgewebe den Farbstoff speichert. Die bei den Mäuseversuchen mitgeteilte Beobachtung, daß kurz nach intravenöser Injektion des Mittels sezierte Tiere stets leuchtend gelb gefärbte Muskeln zeigten, wurde auch bei Hühnern und Kaninchen gemacht. Bei Sektion nach 24 Stunden — nach intravenöser Injektion — war jedoch die Färbung stets verschwunden. Bei einem Kaninchen, das 70′ nach Injektion einer $^1/_2$ proz. Trypaflavinlösung (0,01 g pro 1 kg) in die Ohrvene infolge Herzpunktion zugrunde ging, war die Muskulatur intensiv gefärbt, das Blutserum enthielt nach dem entwicklungshemmenden Wert für Hühnercholerabacillen etwa 1 : 2 Million Trypaflavin, eine Konzentration, die ungefähr der nach 5′ festgestellten gleichkommt. Bei diesem (trächtigen) Tier waren ferner intensiv gefärbt die Ovarien, während Embryo und Fruchtwasser ungefärbt waren. In Milz und Leber war keine Färbung zu sehen, dagegen waren die Nieren sehr stark gefärbt, und die Blase enthielt intensiv gefärbten Urin. Wahrscheinlich geht der Farbstoff sofort in die Muskulatur und in gewisse Organe über und wird von hier aus wieder abgegeben.

*Versuche an Mäusen mit Pneumokokkeninfektion.*

Die Versuche mit Pneumokokken beziehen sich auf die Wirkung der verschiedenen 3,6 Diaminoacridinverbindungen, des Optochin und der Kombination von Optochin und Trypaflavin. Erfahrungen mit anderen Mitteln wurden nur in unzureichendem Maße gesammelt. In Tabelle VIII gebe ich Beispiele. Sie beziehen sich einerseits auf Infektion mit einem hochvirulenten Stamm (Pn. Wa in Versuch Nr. 3) und auf einen nicht so virulenten, der in der Mehrzahl unserer Beobachtungen zur Infektion verwendet wurde (Pn. Jäger).

Die Versuche 1 und 2, mit dem Stamm Jäger, zeigen, daß auch eine Stunde nach der Infektion sich noch eine Beeinflussung nachweisen läßt; dabei geschah die Infektion i. per., die Behandlung subcutan. In Versuch 1 wird durch 1 : 4000 Trypaflavin eine Maus (Nr. 4), in Versuch 2 durch 1 : 6000 Trypaflavin eine Maus (Nr. 11) gerettet; 1 : 8000 zeigt keine Wirkung mehr. Auffallend ist, daß in Versuch 2 Maus 8, 9 und 10, die mit 1 : 2500, 1 : 3000 und 1 : 4000 behandelt waren, mit den Kontrollen starben; in Versuch 1 waren die höheren Dosen nicht ganz wirkungslos: bei Maus 2 wird der Tod nur um 1 Tag, bei Maus 3 um 5 Tage gegenüber der Kontrolle hinausgeschoben. In Versuch 3 erweist sich das Nitrat auch dem außerordentlich virulenten Stamm Pneum Wa gegenüber wirksam, der, wie die Kontrollen zeigen, auch in der Verdünnung 1 : 1 Milliarde noch mit der gewöhnlichen Inkubation von 2 Tagen tötet, allerdings ist nur bei Infektion mit $^1/_{10}$ Millionstel ccm Kultur Rettung eines Tieres zu verzeichnen, bei der 10 mal stärkeren Infektion werden aber bedeutende Verzögerungen des Todes erzielt. Optochin erwies sich in diesem Versuch nicht so wirksam, es rettete nur 1 Tier bei der schwächeren Infektion. Hier ist zu berück-



*Tabelle VIII. Versuche an Mäusen bei Pneumokokkeninfektion.*
**S.B.K = Serumbouillonkultur, Infektion stets i.per.**

| | g | Stamm | Dosis | Behandlung | Ausgang |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 15 | Pneum. Jäger, | 1/5000 ccm S.B.K. | n. 1 h . | †$_2$ |
| 2 | 20 | vor 10 Tagen aus | 1/5000 „ „ | n. 1 h 1:2500 Trypaflav. sc. | †$_3$ |
| 3 | 18 | Pneumonie Spu- | 1/5000 „ „ | n. 1 h 1:3000 „ „ | †$_7$ |
| 4 | 18 | tum isoliert | 1/5000 „ „ | n. 1 h 1:4000 „ „ | Lebt |
| 5 | 11 | Pneum. Jäger, | 1/500000 ccm S.B.K. | . . | Lebt |
| 6 | 17 | vor 24 Stunden | 1/50000 „ „ | . . | †$_2$ |
| 7 | 14 | Mauspassage | 1/5000 ccm S.B.K. | . . | †$_2$ |
| 8 | 17 | | 1/5000 „ „ | n. 1 h 1:2500 Trypaflav. sc. | †$_2$ |
| 9 | 15 | | 1/5000 „ „ | n. 1 h 1:3000 „ „ | †$_2$ |
| 10 | 14 | | 1/5000 „ „ | n. 1 h 1:4000 „ „ | †$_2$ |
| 11 | 13 | | 1/5000 „ „ | n. 1 h 1:6000 „ „ | Lebt |
| 12 | 12 | | 1/5000 „ „ | n. 1 h 1:8000 „ „ | †$_2$ |
| 13 | 15 | Pneum. Wa, vor | 1/1 Milliardst. ccm S.B.K. | . . | †$_2$ |
| 14 | 16 | 24 Stund. Maus- | 1/100 Millionst. „ „ | . . | †$_2$ |
| 15 | 14 | passage | 1/10 „ „ „ | . . | †$_2$ |
| 16 | 21 | | 1/10 „ „ „ | n. 5′ 1:266 Optochin Mur. | †$_2$ |
| 17 | 20 | | 1/10 „ „ „ | n. 5′ 1:266 „ i.per. | Lebt |
| 18 | 20 | | 1/10 „ „ „ | n. 5′ 1:1000 Nitrat | †$_6$ |
| 19 | 17 | | 1/10 „ „ „ | n. 5′ 1:1000 Nitrat i.per. | Lebt |
| 20 | 16 | | 1/1 „ „ „ | . . | †$_2$ |
| 21 | 19 | | 1/1 „ „ „ | n. 5′ 1:266 Optochin mur. | Kollaps |
| 22 | 24 | | 1/1 „ „ „ | n. 5′ 1:266 „ i.per. | u. Tod |
| 23 | 20 | | 1/1 „ „ „ | n. 5′ 1:1000 Nitrat i.per. | †$_6$ |
| 24 | 21 | | 1/1 „ „ „ | n. 5′ 1:1000 „ „ | †$_{12}$ |

sichtigen, daß einerseits die hier benutzte Optochindosis sehr hoch ist, andererseits die günstige Wirkung des Nitrat durch die lokale Behandlung der Infektion erleichtert ist.

*Übersicht über die gesamten Versuche mit Pneumokokken an Mäusen.*

Tabelle IX bringt eine Zusammenstellung der zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion mit Pneumokokken geprüften Dosen unserer Arzneimittel und ihrer Wirksamkeit. Man sieht, daß große Nitratdosen eine Stunde nach der Infektion wirkungslos bleiben, während nach 2, ja nach 4 Stunden zuweilen mit der gleichen Dosis Erfolge erzielt werden. Ähnliche Beobachtungen wurden gelegentlich der Wunddesinfektion gemacht. Zur Erklärung müssen wir an die Möglichkeit denken, daß die Arzneiempfindlichkeit der Erreger auch im Tierkörper Schwankungen unterworfen ist. Trypaflavin wurde später als 1 Stunde nach der Infektion nicht angewendet.

Tabelle X und XI geben eine Übersicht über die Erfolge bei einmaliger Behandlung der Pneumokokkeninfektion nach 5 Minuten. Sie wurden an 5 verschiedenen Stämmen erzielt.





*Tabelle IX. Pneumokokkenversuche an Mäusen.*
**Behandlung zu verschiedenen Zeiten nach der (i. per.) Infektion.**

| | | nach: 5′ | 30′ | 1 St. | 2 St. | 4 St. | 24 St. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nitrat. i. per. . . . . . . | 1 : 1000 | 8 : 2 (5) | — | 3 : 0 | 3 : 1 (2) | 2 : 0 | 2 : 0 |
| Nitrat. s. c. . . . . . . . | 1 : 1000 | 5 : 2 | — | 2 : 0 | 2 : 0 (1) | 2 : 1 | 2 : 0 |
| „ „ „ . . . . . . . | 1 : 1200 | 4 : 1 | 1 : 1 | — | | | |
| Sulfat s. c. . . . . . . . | 1 : 1000 | 2 : 1 | | 2 : 0 | | | |
| Trypaflavin s. c. . . . . . | 1 : 2500 | 1 : 1 | | 2 : 0 (1) | | | |
| „ „ „ . . . . . . | 1 : 3000 | 5 : 4 | — | 2 : 0 (1) | | | — |
| „ „ „ . . . . . . | 1 : 4000 | 5 : 1 | | 2 : 1 | — | | |
| „ „ „ . . . . . . | 1 : 6000 | 7 : 1 | | 1 : 1 | | | |
| „ „ „ . . . . . . | 1 : 8000 | 6 : 0 (3) | — | 1 : 0 | | | |

NB. 8 : 2 (5) bedeutet: von 8 Mäusen 2 gerettet. 5 verzögert gestorben.

*Tabelle X. Pneumokokkenversuche an Mäusen.*
**Behandlung intraperitoneal 5 Min. nach der (i. per.) Infektion.**

| | 1 : 266 | 1 : 1000 | 1 : 2000 | 1 : 2500 | 1 : 8000 | 1 : 4000 | 1 : 6000 | 1 : 8000 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Trypaflavin in Öl . . | . | . | . | 1 : 1 | . | 1 : 1 | 1 : 0 (1) | . |
| Acridinbase in Öl . . | . | 2 : 1 (1) | 2 : 2 | . | . | 2 : 2 | . | . |
| Trypaflavin in Wasser | . | . | . | . | 2 : 2 | 1 : 0 (1) | 1 : 0 (1) | . |
| Sulfat in Wasser . . | . | 1 : 1 | . | 1 : 1 | . | . | . | . |
| Nitrat in Wasser . . | . | 8 : 2 (5) | 1 : 0 | 1 : 1 | . | 1 : 0 | 1 : 0 | 1 : 0 |
| Chrysanilin in Wasser | . | 2 : 0 | . | . | . | . | . | . |
| Optochin in Wasser . | 2 : 1 | . | . | . | . | . | . | . |

*Tabelle XI. Pneumokokkenversuche an Mäusen. Infektion i. per.*
**Behandlung subcutan 5 Min. nach der Infektion. Sämtliche Medikamente sind in Wasser gelös[t]**

| | 1 : 266 | 1 : 400 | 1 : 500 | 1 : 600 | 1 : 800 | 1 : 1000 | 1 : 1200 | 1 : 2000 | 1 : 2500 | 1 : 3000 | 1 : 4000 | 1 : 6000 | 1 : 8000 | 1 : 10000 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Trypaflavin | . | . | . | . | . | . | . | . | 1 : 1 | 5 : 4 | 5 : 1 | 7 : 1 | 6 : 0 (3) | 4 : 0 [illegible] |
| Sulfat . . | . | . | . | . | . | 2 : 1 | . | 2 : 0 | . | . | 2 : 0 | . | 2 : 0 | . |
| Nitrat . . | . | . | . | . | . | 5 : 2 | 5 : 2 | 1 : 1 | . | . | 1 : 1 | 2 : 0 | . | . |
| Optochin mur. . | 7 : 5 (2) | 2 : 2 | 2 : 2 | 2 : 2 | 4 : 4 | 4 : 3 (1) | . | 10 : 3 (3) | 2 : 1 | . | 6 : 0 (2) | 2 : 0 | 2 : 1 | 2 : 0 |

Die Versuche mit 2 von diesen Stämmen sind schon in Tabelle VIII enthalten, ein 3. Stamm wurde nur an 3 Mäusen geprüft: 2 subcutan mit 1 : 1000 Nitrat behandelte Tiere starben mit den Kontrollen, eine mit derselben Dosis i. per. behandelte Maus wurde gerettet. Der 4. Stamm war ein Pneumokokkus, der gelegentlich unserer Choleraversuche in mehreren Mäusen als Mischinfektion aufgefunden wurde und sich fast avirulent erwies: zur Infektion wurde $^1/_2$ ccm Bouillonkultur i. per. injiziert, $^1/_3$ ccm tötete auch noch, $^1/_4$ nicht mehr. Der Stamm ließ sich durch Galle nicht auflösen und wurde durch Optochin im Reagensglas und im Tierversuch nicht beeinflußt. Mitunter wurde allerdings eine Verzögerung des Todes beobachtet und in vitro einmal eine Steigerung der Optochinempfindlichkeit von 1 : 8000 auf 1 : 80 000 nach Tierpassage festgestellt. Auf diesen Stamm beziehen sich die 4 Heilungen bei subcutaner Applikation von 1 : 3000 Trypaflavin. Hier geht also die Wirkung der beiden Mittel Optochin und Trypaflavin in vivo und in vitro parallel.

Der 5. Stamm, den wir benutzten, war aus pneumonischem Sputum auf der Blutplatte isoliert. Die Virulenz war noch gut, allerdings nicht sehr hoch: $^1/_{10000}$ ccm i. per. der Kultur tötete in 3, statt, wie gewöhnlich, in 2 Tagen, $^1/_{100000}$ und $^1/_1$ Millionstel Kubikzentimeter ließ die Mäuse am Leben. Dementsprechend erwies sich der Stamm im Reagensglas und im Tierversuch als normal empfindlich gegenüber Optochin; 1 : 266 Optochin mur. s. c. rettete alle 3 mit $^1/_{10000}$ ccm infizierte Mäuse, im Reagensglas war die Entwicklung noch bei 1 : 200 000 aufgehoben, auch in Galle war der Stamm gut löslich. In dem therapeutischen Versuch erwies sich Optochin dem Nitrat überlegen. Von 5 mit 1 : 1200 Nitrat s. c. behandelten Mäusen überlebten nur 2. Immerhin ist auch dieser 5. Stamm der Behandlung mit 3,6 Diaminoacridin zugänglich gewesen.

Im ganzen zeigte sich die Wirkung des Optochin gegenüber virulenten (gallelöslichen) Pneumokokken der der Acridinpräparate deutlich überlegen, wobei aber in Betracht zu ziehen ist, daß der Stamm Jäger, mit dem die meisten Versuche angestellt wurden, ganz auffallend empfindlich gegen Optochin war: wie Tabelle XI zeigt, wurden noch durch Verdünnungen von 1 : 2000 Mäuse gerettet.

Vergiftete Mäuse sind in Tabelle X nicht mitgezählt, da die desinfizierende Wirkung dieser Präparate aus den übrigen Versuchen klar hervorgeht. Es starben ohne Bakterien je 1 Maus durch 1 : 1000 Acridinbase, 1 : 1000 Nitrat und 1 : 2500 Trypaflavin, die Verdünnung 1 : 200 Acridinbase, die 3 mal Tod ohne Pneumokokken verursachte, wurde gar nicht aufgeführt. Die Schädlichkeit der an der Grenze der Giftigkeit stehenden Dosen, die sich darin äußert, da die betreffenden Tiere an der Infektion sterben, während mit geringerer Dosis behandelte Tiere am Leben bleiben (conf. Tab. VIII, Versuch 1 u. 2), gilt nach Tab. XI auch für die Optochinbehandlung, wo 1 : 266 schlechtere Resultate aufweist als die Verdünnungen 1 : 400 bis 1 : 800.

Ein Vergleich der Tabellen X und XI fällt wieder wie bei der Hühnercholerainfektion (Tab. II u. III) zugunsten der intraperitonealen Behandlung aus, allerdings stehen nicht gleichviel Versuche einander gegenüber.

In der ersten Mitteilung von *Neufeld* und *Schiemann* wurde ein Versuch mit kombinierter Anwendung von Optochin und Trypaflavin mitgeteilt. Es ergab sich ein sehr günstiges Zusammenwirken, indem recht kleine Dosen beider Mittel einen prompten Erfolg hatten. Wie schon in der erwähnten Mitteilung berichtet wurde, konnte gleichzeitig in einem Reagensglasversuch nachgewiesen werden, daß bei Verwendung einer Kombination, wenn von jedem Mittel nur ein Bruchteil der an sich entwicklungshemmenden Grenzdosis angewendet wurde, noch Aufhebung der Entwickelung eintrat. Aber sowohl im Reagensglas wie im Tierversuch wurde dieser Erfolg nicht regelmäßig erzielt, auffallenderweise fielen einige spätere Versuche viel ungünstiger aus.



*Versuche an Kaninchen und Meerschweinchen.*

Bei pneumokokkeninfizierten Kaninchen wurde durch Trypaflavin i. ven. nur eine Verzögerung des Todes erzielt. Durch Behandlung mit 1 ccm 1 : 100 Trypaflavin i. ven. pro 1 kg Tier wurde ein am Ohr subcutan mit infiziertem Blut geimpftes Kaninchen 4 Tage am Leben erhalten, während die Kontrolle in 24 Stunden, ein mit der doppelten Dosis Trypaflavin behandeltes Kaninchen in 3 Tagen der Infektion erlag. Weitere Versuche an Kaninchen wurden nicht angestellt.

An Meerschweinchen erhielten wir bei intraperitonealer Infektion mit dem sonst gut beeinflußten Stamm Pneum. Jäger bei intraperitonealer Behandlung mit 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 ccm der wässerigen 1 proz. Lösung von Trypaflavin auf 200 g Tier einen deutlichen Effectus contrarius. Drei Kontrollen blieben am Leben, während beide mit der Dosis 0,4, von den mit geringeren Dosen behandelten Tieren je eines der Infektion erlag. Auch bei intrapulmonaler Infektion mit Pleuraexsudat, wobei ein anderer Pneumokokkenstamm verwendet wurde, und mehrmaliger subcutaner Behandlung mit Trypaflavin in Öl und in Wasser wurde kein Erfolg erzielt. Es wurden dabei bis 0,28 ccm 1 proz. öliger Trypaflavinlösung 2 mal täglich pro 200 g Tier verabreicht. Ein so behandeltes Tier lebte 3 Tage, ein mit 0.2 der gleichen Lösung 2 mal täglich behandeltes 5 Tage, während 2 Kontrollen 4 Tage, eine 3. gar 11 Tage lebten. Auch 3 Meerrschweinchen, die 0,4 und 0,6 der 1 proz. wässerigen Trypaflavinlösung einmal täglich erhalten hatten, starben etwa gleichzeitig mit den Kontrollen.

*Versuche mit Mäusen bei Streptokokkeninfektion.*

Mit Streptokokken wurden nur wenige Versuche angestellt, und zwar nur mit Trypaflavin (Tab. XII).

Gegenüber Streptokokkus Aronson wurde in Versuch 1 trotz ziemlich hoher Virulenz ein deutlicher Erfolg erzielt; 5 und 30 Minuten nach der Infektion, die mindestens die 10fache, aber nicht die 100fache tödliche Dosis erreichte, wurden 2 von 4 Tieren gerettet. In einem anderen Versuch, wo die Behandlung erst 1 Stunde nach der Infektion einsetzte, versagte sie. Ein anderer Streptokokkenstamm wurde in Versuch 2 deutlich beeinflußt: bei der mindestens 10fach tödlichen Infektion wurde von 2 Mäusen eine, bei der gerade noch in 2 Tagen tötenden Infektionsdosis beide Mäuse gerettet. In einem zweiten Versuch mit 10fach stärkerer Infektion (100fach letale Dosis) war die Behandlung erfolglos.

Morphologisch verhielt sich der Stamm Gräf auch in Serumbouillon wie ein echter Streptococcus longus, während der Stamm Aronson nur in gewöhnlicher (über 4‰ lackmusalkalischer) Bouillon in typischen



*Tabelle XII.*

***Streptokokken-Versuche an Mäusen.*** **Bezeichnung wie in Tab. I und VIII.**

| g | Infektion: Stamm | | Infektion: Dosis | Behandlung | | | | Ausgang |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 16 | Aronson vor | i.per. | 1/5000 ccm S.B.K. | . | | . | . | $\dagger_2$ |
| 17 | 24 Stunden | „ | 1/5000 „ „ | n. 1h | 1:2500 | Trypaflavin | s.c. | $\dagger_2$ |
| 17 | Mauspassage | „ | 1/5000 „ „ | n. 1h | 1:2500 | „ | „ | $\dagger_2$ |
| 17 | | „ | 1/5000 „ „ | n. 1h | 1:2500 | „ | „ | $\dagger_2$ |
| 13 | Aronson vor | „ | 1/100 Mill. ccm S.B.K. | . | | . | . | Lebt |
| 14 | 14 Tagen | „ | 1/10 „ „ „ | . | | . | . | $\dagger_2$ |
| 14 | Mauspassage | „ | 1/1 „ „ „ | . | | . | . | $\dagger_2$ |
| 15 | | „ | 1/1 „ „ „ | n. 5′ | 0,5 ccm | NaCl-Lös. | i.per. | $\dagger_2$ |
| 15 | | „ | 1/1 „ „ „ | n. 5′ | 1:3000 | Trypaflavin | „ | Lebt |
| 18 | | „ | 1/1 „ „ „ | n. 5′ | 1:3000 | „ | „ | $\dagger_2$ |
| 17 | | „ | 1/1 „ „ „ | n. 30′ | 1:3000 | „ | „ | $\dagger_2$ |
| 16 | | „ | 1/1 „ „ „ | n. 30′ | 1:3000 | „ | „ | Lebt |
| 12 | Gräf vor | „ | 1/100000 ccm S.B.K. | . | | . | . | $\dagger_1$ |
| 15 | 3 Wochen | „ | 1/10000 „ „ | . | | . | . | $\dagger_2$ |
| 19 | Mauspassage | „ | 1/1000 „ „ | . | | . | . | $\dagger_1$ |
| 18 | | „ | 1/1000 „ „ | n. 5′ | 0,5 ccm | Bouillon | i.per. | $\dagger_1$ |
| 22 | | „ | 1/1000 „ „ | n. 5′ | 1:3000 | Trypaflavin | „ | $\dagger_2$ |
| 25 | | „ | 1/1000 „ „ | n. 5′ | 1:3000 | „ | „ | $\dagger_2$ |
| 17 | | „ | 1/1000 „ „ | n. 30′ | 1:3000 | „ | „ | $\dagger_1$ |
| 17 | | „ | 1/1000 „ „ | n. 30′ | 1:3000 | „ | „ | $\dagger_2$ |
| 17 | | „ | 1/1000 „ „ | n. 5′ | 1:3000 | „ | s.c. | $\dagger_1$ |
| 20 | | „ | 1/1000 „ „ | n. 5′ | 1:3000 | „ | „ | $\dagger_1$ |
| 17 | | „ | 1/1000 „ „ | n. 30′ | 1:3000 | „ | „ | $\dagger_2$ |
| 19 | | „ | 1/1000 „ „ | n. 30′ | 1:3000 | „ | „ | $\dagger_2$ |
| 22 | Gräf vor | „ | 1/1 Millionst. ccm S.B.K. | . | | . | . | Lebt |
| 18 | 5 Tagen | „ | 1/1 „ „ „ | . | | . | . | „ |
| 17 | Mauspassage | „ | 1/100000 ccm | . | | . | . | $\dagger_2$ |
| 16 | | „ | 1/10000 „ | . | | . | . | $\dagger_1$ |
| 16 | | „ | 1/10000 „ | n. 5′ | 1:3000 | Trypaflavin | i.per. | $\dagger_2$ |
| 16 | | „ | 1/10000 „ | n. 5′ | 1:3000 | „ | „ | Lebt |
| 16 | | „ | 1/100000 „ | n. 5′ | 1:3000 | „ | „ | „ |
| 16 | | „ | 1/100000 „ | n. 5′ | 1:3000 | „ | „ | „ |

Ketten wuchs und die Bouillon nicht trübte, in Serumbouillon dagegen seiner Form und seinem Wachstum nach sehr dem Pneumokokkus ähnelte.

Die soeben besprochenen Erfolge bei Streptokokkeninfektion wurden bei Mäusen erzielt, die intraperitoneal infiziert und ebenfalls i. per. behandelt wurden; auch hier liegt wieder die Möglichkeit vor, daß es sich zum Teil um eine örtliche bactericide Wirkung handelt.

In dem letzten Versuch wurden 2 Mäuse mit NaCl-Lösung bzw. Bouillon statt des Mittels behandelt, das in den Streptokokkenversuchen stets im Volumen 0,5 ccm injiziert wurde.



*Versuche an Mäusen mit Micrococcus melitensis, Shiga-Krusebacillen und Diphtheriebacillen.*

Nur mit Trypaflavin in ganz wenigen Versuchen wurden ferner die intraperitonealen Infektionen mit Micrococcus melitensis, Shiga-Krusebacillen und Diphtheriebacillen zu beeinflussen gesucht; alle diese Bakterien sind in vitro stark empfindlich gegen das Mittel.

Es wurde je eine Maus mit dem Melitensisstamm Wright und Charité infiziert. Von ersterem Stamm wurden 2 Ösen, von dem zweiten, etwas virulenteren 1 Öse Agarkultur i. per. gegeben. Die Behandlung geschah subcutan mit 1 : 2500 Trypaflavin sofort nach der Infektion. Beide behandelten Tiere blieben am Leben, während Stamm Wright die Kontrolle in 5, Stamm Charité in 3 Tagen tötete. Die mit dem virulenteren Stamm infizierte Maus erkrankte allerdings nach 5 Tagen, erholte sich aber wieder, um am 13. Tage interkurrent zu sterben.

Ein in derselben Weise (Infektion 1 Öse i. per., Behandlung 5 Minuten nach der Infektion s. c. mit 1 : 2500 Trypaflavin) an je einer Maus mit 3 Shigastämmen angestellter Versuch ergab nur eine Verzögerung des Todes, und zwar lebte die mit dem 1. Stamm infizierte Maus 1, die andere 2, die dritte 4 Tage länger, als die zugehörige Kontrolle.

Entsprechende Versuche mit Diphtheriebacillen nahmen folgenden Verlauf. Von 2 Diphtheriestämmen, dem bekannten Parker-Williamstamm Nr. 8 und einem anderen Laboratoriumsstamm, die sich in Vorversuchen als pathogen für Mäuse erwiesen hatten, wurden je 2 Kontrollen, eine mit $^1/_5$ und eine mit $^1/_{20}$ Öse Löfflerkultur i. per. infiziert, jeder Kontrolle entsprach ein behandeltes Tier. Es wurde wieder subcutane Behandlung mit 1 : 2500 Trypaflavin angewendet. Sämtliche Tiere starben, und zwar starben von den behandelten Tieren die mit der größeren Dosis infizierten gleichzeitig mit den Kontrollen in 3—4 Tagen, die mit $^1/_{20}$ Öse infizierten überlebten die Kontrollen, das mit Di Nr. 8 infizierte um 1 Tag, das andere um 4 Tage. In letzterem Tier ließen sich bei der Sektion spärlich Bacillen in Milz und Nebennieren nachweisen, bei den übrigen mißlang der Nachweis.

Da *Kolle* und *Schloßberger* angegeben haben, daß frisch gezüchtete Diphtheriestämme öfters bei subcutaner Infektion Pathogenität für Mäuse besitzen, haben wir eine Anzahl frisch isolierter Stämme in Mengen von $^1/_{20}$ und $^1/_{50}$ Öse untersucht, ohne jedoch eine Infektion zu erzielen. Nur 3 Stämme, die in Mengen von $^1/_5$ Öse s. c. gegeben wurden, wobei aber die infizierten Mäuse vorher eine Wundbehandlung gegen Streptokokken durchgemacht und noch eine latente Infektion behalten hatten, töteten die Tiere. Hier ergab aber die Sektion eine Streptokokkensepticämie, wobei allerdings 2 Mäuse auch in der Milz ziemlich reichlich Diphtheriebacillen aufwiesen.

### *Versuche an Mäusen bei Milzbrand.*

Es wurden nur wenige Versuche mit 3,6-Diaminoacridinverbindungen angestellt, aus denen aber hervorgeht, daß sie der bactericiden Wirkung im Reagensglas entsprechend auch in vivo die Infektion beeinflussen.

Geprüft wurden Trypaflavin, das Chlorid und das Nitrat. Alle 3 Mittel heben etwa in den Verdünnungen 1 : 100 000 bis 1 : 300 000 die Entwicklung der Bacillen auf. Ersteres in Konzentration 1 : 2500 s. c. gegeben rettete von 5 behandelten Mäusen eine, eine andere starb ohne Bacillen. Nitrat 1 : 1000 s. c. bewirkte unter 3 Fällen, in denen es zur Anwendung kam, 2 mal eine Verzögerung von 1—2 Tagen; Chlorid, das je 1 mal in den Verdünnungen 1 : 1250, 1 : 2500 und 1 : 2000 s. c. gegeben wurde, ergab bei 1 : 1250 eine Verzögerung von 3 Tagen, durch die beiden anderen Dosen um je 1 Tag. Es scheint, daß nur schwächere, etwas langsamer verlaufende Infektionen mit Milzbrand überhaupt beeinflußbar sind. Das gilt auch von den übrigen geprüften Mitteln. Geprüft wurden noch die Triphenylmethanderivate: Trypar san, das nach einem Reagensglasversuch bei 1 : 100 000 Entwicklungshemmung bedingte, bei 1 : 1 Million Wachstum zuließ, Dahlia (Grübler), das in einigen Versuchen in Verdünnung 1 : 1 Million das Wachstum aufhob, ferner 3 im Reagensglas gleich stark wirkende, bei 1 : 10 Million Hemmung, 1 : 100 Million Wachstum bedingende Mittel, nämlich Brillantgrün (extra, Badische Anilinwerke), Krystallviolett (B. Höchst) und Methylviolett. Die Mäuse wurden meist subcutan nach 5 Minuten behandelt, die Infektion geschah teils i. per., teils subcutan.

Ich gebe im folgenden einige Beispiele:

Aus Versuch 1—4 geht die Abhängigkeit des Erfolges von der Schwere der Infektion hervor. Trypaflavin hat in Versuch 1, wo die 100fach tödliche Dosis verwendet wurde, keinen Erfolg gehabt, in Versuch 2, wo die Infektion unterhalb der 10fach tödlichen Dosis bleibt, stirbt Maus 9 infolge der Behandlung um einen Tag verspätet und ohne Bacillen, eine andere Maus (Nr. 7) überlebt. In diesem Versuch wurden auch durch 1 : 500 und 1 : 1000 Dahlia 2 Mäuse (Nr. 10 und 11) gerettet. Während Krystallviolett in Dosis 1 : 2000 ein Tier (Nr. 16) sterilisierte, hat es in doppelt so hoher Dosis eine Beschleunigung der Infektion verursacht.

In Versuch 4 rettet Brillantgrün 2 Tiere, während es in Versuch 3 in derselben Dosis versagte. Beide Versuche wurden gleichzeitig mit demselben Infektionsmaterial angestellt, nur geschah die Infektion in Versuch 3 i. per., in Versuch 4 s. c. Der spätere Tod der Kontrollen und der bessere Erfolg der Therapie in Versuch 4 stehen in ursächlichem Zusammenhang.

Bei diesen Versuchen wurde wieder die schon von *Schiemann* und *Ishiwara* gemachte Erfahrung, daß es für eine sichere Dosierung von Milzbrandkulturen notwendig ist, die Aufschwemmungen durch Schütteln mit Glasperlen fein zu verteilen, erneuert; Verreibungen mit der Öse erwiesen sich als unbrauchbar.

Krystallviolett 1 : 1000 und 1 : 2000 i. ven. gegeben, hatte keinen Erfolg.

In Versuch 5 der Tabelle XIII ist intravenöse Anwendung von Brillantgrün und Dahlia versucht worden. Brillantgrün 1 : 2000 i. ven. tötete 4 Mäuse in



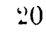






*Tabelle XIII.* **Versuche an Mäusen mit Milzbrand.**

| Versuch | Nr. | g | Infektionen | | | Behandlung | | | Ausg |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Stamm | | Dosis | | | | |
| 1 | 1 | 19 | Amtsberg | i.per. | $^1/_1$ Millionstel Öse Ag.K. | . | . | . | †$_1$ |
| | 2 | 20 | Vor 24 Stund. | „ | $^1/_{10\,000}$ Öse Ag.K. | . | . | . | †$_2$ |
| | 3 | 21 | Mauspassage | „ | $^1/_{10\,000}$ „ „ | n. 5′ | 1:2500 Trypaflavin | s.c. | †$_2$ |
| | 4 | 19,5 | | „ | $^1/_1$ Millionstel Öse Ag.K. | n. 5′ | 1:2500 „ | „ | †$_2$ |
| 2 | 5 | 14 | Amtsberg | i.per. | $^1/_{10}$ Millionst. Öse Ag.K. | . | . | . | Lebt |
| | 6 | 14 | Vor 24 Stund. | „ | $^1/_1$ Millionstel Öse Ag.K. | . | . | . | †$_4$ |
| | 7 | 14 | Mauspassage | „ | $^1/_1$ „ „ „ | n. 5′ | 1:2500 Trypaflavin | s.c. | Lebt |
| | 8 | 15 | | „ | $^1/_1$ „ „ „ | n. 5′ | 1:2500 „ | „ | †$_2$ |
| | 9 | 15 | | „ | $^1/_1$ „ „ „ | n. 5′ | 1:2500 „ | „ | OhneB |
| | 10 | 14 | | „ | $^1/_1$ „ „ „ | n. 5′ | 1:500 Dahlia | „ | Lebt |
| | 11 | 14 | | „ | $^1/_1$ „ „ „ | n. 5′ | 1:1000 „ | „ | „ |
| | 12 | 15 | | „ | $^1/_1$ „ „ „ | n. 5′ | 1:1000 Krystallviol. | „ | †$_1$ |
| | 13 | 17 | | „ | $^1/_1$ „ „ „ | n. 5′ | 1:1000 „ | „ | †$_1$ |
| | 14 | 16 | | „ | $^1/_1$ „ „ „ | n. 5′ | 1:1000 „ | „ | †$_3$ |
| | 15 | 13 | | „ | $^1/_1$ „ „ „ | n. 5′ | 1:2000 „ | „ | †$_4$ |
| | 16 | 14 | | „ | $^1/_1$ „ „ „ | n. 5′ | 1:2000 „ | „ | OhneB |
| | 17 | 17 | | „ | $^1/_1$ „ „ „ | n. 5′ | 1:2000 „ | „ | †$_3$ |
| 3 | 18 | 14 | Sobernheim | i.per. | $^1/_{300}$ Blutverdünnung | . | . | . | †$_1$ |
| | 19 | 15 | Mausblut | „ | $^1/_{30}$ „ | . | . | . | †$_1$ |
| | 20 | 15 | | „ | $^1/_{30}$ „ | n. 5′ | 1:1000 Brillantgrün | s.c. | †$_1$ |
| | 21 | 22 | | „ | $^1/_{30}$ „ | n. 5′ | 1:1000 „ | „ | †$_1$ |
| | 22 | 15 | | „ | $^1/_{30}$ „ | n. 5′ | 1:1000 Krystallviol. | „ | †$_1$ |
| | 23 | 16 | | „ | $^1/_{30}$ „ | n. 5′ | 1:1000 „ | „ | †$_1$ |
| | 24 | 17 | | „ | $^1/_{30}$ „ | n. 5′ | 1:1000 Dahlia | „ | †$_1$ |
| | 25 | 23 | | „ | $^1/_{30}$ „ | n. 5′ | 1:1000 „ | „ | Spärl. B |
| 4 | 26 | 14 | Dasselb. Blut | s.c. | $^1/_{300}$ Blutverdünnung | . | . | . | †$_2$ |
| | 27 | 14 | wie in | „ | $^1/_{30}$ „ | . | . | . | †$_4$ |
| | 28 | 14 | Versuch 3 | „ | $^1/_{30}$ „ | n. 5′ | 1:1000 Brillantgrün | s.c. | Lebt |
| | 29 | 17 | | „ | $^1/_{30}$ „ | n. 5′ | 1:1000 „ | „ | „ |
| | 30 | 15 | | „ | $^1/_{30}$ „ | n. 5′ | 1:1000 Krystallviol. | „ | †$_2$ |
| | 31 | 16 | | „ | $^1/_{30}$ „ | n. 5′ | 1:1000 „ | „ | †$_4$ |
| 5 | 32 | 15 | Amtsberg | s.c. | $^1/_{100\,000}$ Öse Ag.K. | . | . | . | †$_3$ |
| | 33 | 13 | Vor 10 Tagen | „ | $^1/_{10\,000}$ „ „ | . | . | . | †$_3$ |
| | 34 | 14 | Mauspassage | „ | $^1/_{10\,000}$ „ „ | . | . | . | †$_4$ |
| | 35 | 21 | | „ | $^1/_{10\,000}$ „ „ | n. 1 St. | 1:5000 Brillantgrün | i.ven. | †$_3$ |
| | 36 | 21 | | „ | $^1/_{10\,000}$ „ „ | n. 1 St. | 1:5000 „ | „ | †$_4$ |
| | 37 | 18 | | „ | $^1/_{10\,000}$ „ „ | n. 1 St. | 1:5000 „ | „ | †$_4$ |
| | 38 | 17 | | „ | $^1/_{10\,000}$ „ „ | n. 1 St. | 1:1000 „ | s.c. | OhneB |
| | 39 | 17 | | „ | $^1/_{10\,000}$ „ „ | n. 1 St. | 1:1000 „ | „ | †$_6$ |
| | 40 | 15 | | „ | $^1/_{10\,000}$ „ „ | n. 1 St. | 1:1000 „ | „ | Lebt (Nekr a.d. Injektion |
| | 41 | 15 | | „ | $^1/_{10\,000}$ „ „ | n. 1 St. | 1:1000 Dahlia | i.ven. | †$_3$ |
| | 42 | 22 | | „ | $^1/_{10\,000}$ „ „ | n. 1 St. | 1:1000 „ | „ | †$_5$ |
| | 43 | 18 | | „ | $^1/_{10\,000}$ „ „ | n. 1 St. | 1:2000 „ | „ | †$_4$ |
| | 44 | 15 | | „ | $^1/_{10\,000}$ „ „ | n. 1 St. | 1:500 „ | s.c. | †$_4$ |
| | 45 | 16 | | „ | $^1/_{10\,000}$ „ „ | n. 1 St. | 1:500 „ | „ | †$_2$ |
| | 46 | 16 | | „ | $^1/_{10\,000}$ „ „ | n. 1 St. | 1:500 „ | „ | Lebt (Nekr a.d. Injektion |



1 Stunde, 3 mit 1:4000 i. ven. behandelte Mäuse starben ebenfalls in 2—24 Stunden an der Vergiftung, erst 1 : 5000 wurde vertragen. Therapeutisch war es jedoch ohne Erfolg. Alle 3 so behandelten Mäuse (Nr. 35—37) erlagen der Infektion wie die Kontrollen, während 3 mit 1 : 1000 Brillantgrün s. c. behandelte Tiere sämtlich in ihrer Infektion beeinflußt wurden. Maus 38 starb in 2 Tagen ohne Bacillen, Maus 39 an der Infektion, aber 2 Tage nach der Kontrolle, und Maus 40 überlebte. Auch Dahlia, das in Konzentration 1 : 1000 i. ven. vertragen wurde, wirkte schlechter als subcutan. Maus 42 erlebt allerdings eine geringe Verzögerung durch intravenöse Behandlung, demgegenüber wird durch 1 : 500 Dahlia s. c. von 3 Mäusen eine gerettet (Maus 46).

In diesem Versuch zeigte es sich, daß die Milzbrandinfektion mitunter sich sogar 1 Stunde post infectionem beeinflussen läßt. Es wurden aber nur wenig Versuche nach diesem Zeitraum angestellt. Im ganzen hatten wir den Eindruck, daß — wie ja an den ersten 4 Versuchen demonstriert wurde — nur leichtere Infektionen der Behandlung zugänglich sind.

Bezüglich der Giftigkeit der Präparate ergibt sich, daß Brillantgrün bei intravenöser Injektion noch giftiger ist als Trypaflavin, das bereits in der Dosis 1 : 4000 vertragen wurde, wie gelegentlich der Hühnercholeraversuche mitgeteilt wurde. Bei subcutaner Anwendung dagegen ist Trypaflavin giftiger.

*Tabelle XIV. Milzbrandversuche an Mäusen.*

Subcutan-Behandlung.

Einfluß der Behandlung bei tödlicher und bei zu geringer Infektion. Die eingeklammerten Zahlen betreffen Tiere aus solchen Versuchen, in denen sämtliche Kontrollen am Leben bleiben.

| Mittel | Konzentration | Im ganzen behandelt | Davon gerettet | Es starben | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | ohne Bacillen | an der Infektion verzögert | mit den Kontrollen | Trotz Überlebens der Kontrollen (eff. cont.) |
| Trypaflavin . . | 1:2500 | 5 (3) | 1 (1) | 1 | 0 | 3 | (2) |
| Methylviolett | 1:300—800 | 4 (2) | 0 (2) | 3 | 0 | 1 | (0) |
| | 1:1000—1600 | 5 (1) | 2 (1) | 0 | 0 | 3 | (0) |
| Dahlia . . . | 1:250—500 | 9 (7) | 2 (6) | 0 (1) | 2 | 5 | (0) |
| | 1:1000 | 5 (7) | 1 (7) | 1 | 0 | 3 | (0) |
| Krystallviolett | 1:300—600 | 2 (2) | 0 (2) | 2 | 0 | 0 | (0) |
| | 1:1000—2000 | 16 (7) | 3 (3) | 2 (2) | 0 | 11 | (2) |
| Brillantgrün . | 1:400—600 | 6 (2) | 1 | 4 (1) | 0 | 1 | (1) |
| | 1:1000—3000 | 15 (15) | 5 (12) | 3 (1) | 2 | 5 | (2) |
| | 1:4000 | 0 (2) | 0 (2) | 0 | 0 | 0 | (0) |

Von allen benutzten Präparaten gilt, daß sie bei jeder Applikation für den Organismus sehr giftig sind, und zwar tritt, wie Tabelle XIV zeigt, die — für die 3,6-Diaminoacridinverbindungen schon besprochene — Begünstigung der Infektion durch hohe Dosen des Mittels, die aber in anderen Fällen auch therapeutisch wirken können, auch bei den Triphenylmethanfarbstoffen Krystallviolett und Brillantgrün auf.

Tabelle 14 gibt eine Übersicht über alle Milzbrandversuche. Dabei sind — durch die eingeklammerten Zahlen — auch die Todes-





fälle verzeichnet, welche die Therapie an Tieren verursachte, die, wie die Kontrollen lehrten, mit für normale Tiere nicht tödlichen Dosen infiziert waren. Wir sehen, daß Brillantgrün 1 : 400 bis 1 : 600 besonders ungünstig wegkommt, denn diese Therapie vermochte nur 1 von 6 behandelten Tieren zu heilen, 1 starb mit und 4 ohne Bacillen. Bei nicht virulenter Infektion starb eins ohne Bacillen, das andere an der Infektion. 1 : 1000 und 1 : 3000 Brillantgrün bewirkte ebenfalls noch je 1 mal Begünstigung der Infektion unter 15 behandelten Tieren, während bei Behandlung einer gleichen Anzahl genügend infizierter Tiere 5 gerettet wurden und 2 eine geringe Lebensverlängerung gewannen. Auch Trypaflavin und Krystallviolett wirkten ähnlich.

### *Schlußsätze.*

1. Nach den mitgeteilten Versuchen sind mehrere Verbindungen der Acridinreihe, ferner Triphenylmethanderivate und Chinolinderivate im Tierversuch wirksam gegen eine Anzahl septicämischer Bakterien. Im ganzen wurden bisher nur bei nicht zu starker Infektion Erfolge erzielt.

2. Bei allen erwähnten Farbstoffen beobachtet man gelegentlich die von *Ehrlich* als Effectus contrarius bezeichnete Erscheinung.

3. Die meisten Versuche bestanden in subcutaner oder intraperitonealer Behandlung von Mäusen 5—15 Minuten nach der Infektion. Einige Versuche fielen auch nach 2—4 Stunden positiv aus.

4. Einige Versuche mit intravenöser Behandlung waren ohne Erfolg; auch durch mehrfache Behandlung haben wir keine Verbesserung erzielt. Dagegen scheint Anwendung der Mittel subcutan oder intraperitoneal in öliger Lösung bessere Erfolge zu ergeben.

5. Bei Streptokokken und Friedländerbacillen wurden nur bei intraperitonealer Behandlung Erfolge erzielt. Diese sind zum Teil als lokale Wirkung aufzufassen. Überhaupt sind Trypaflavin und die andern von uns bisher untersuchten Acridinverbindungen zweifellos keine optimalen Substanzen für die Allgemeinbehandlung wegen ihrer zu starken Organotropie. Andererseits ist diese bei örtlicher Anwendung, wie bei Wunddesinfektion vorteilhaft. Daher sind die Acridinstoffe auch bei der experimentellen Cholerainfektion intraperitoneal relativ gut wirksam (vgl. *Baumgarten*). Jedenfalls sind bisher die von uns untersuchten Acridinstoffe die einzigen chemischen Mittel, mit denen eine Heilung der experimentellen Cholerainfektion gelungen ist.

6. Intravenös injiziertes Trypaflavin verschwindet verhältnismäßig schnell aus dem Kreislauf, insbesondere auch der Maus.

7. Unsere Erfolge gegen Septicämieerreger wurden an Mäusen erzielt. Einige Versuche an Meerschweinchen, Kaninchen, Hühnern fielen fast durchweg negativ aus.



8. Das Hauptinteresse an unseren Versuchen sehen wir in dem grundsätzlichen Ergebnis, daß zahlreiche Farbstoffe imstande sind, Infektionen durch einen oder mehrere der untersuchten Erreger (Hühnercholera, Pneumokokken, Streptokokken, Milzbrandbacillen, Friedländerbacillen) zu beeinflussen und bei nicht zu schwerer Infektion einen Teil der behandelten Tiere zu retten. Diese Mittel erscheinen daher geeignet, als Ausgangspunkt für weitere Forschungen zu dienen, um teils allgemein, teils örtlich noch besser wirksame Verbindungen zu finden.

9. Außer bei Chinolingelb, dessen Wirkungsweise noch aufzuklären bleibt, ergaben die Versuche in vitro eine starke entwicklungshemmende und bactericide Wirkung der im Tierkörper wirksamen Stoffe.

Ein Pneumokokkenstamm, der in vitro nur durch Trypaflavin, nicht aber durch Optochin beeinflußt wurde, zeigte in vivo dasselbe Verhalten.

10. Auch Sublimat zeigte eine Heilwirkung (gegen Friedländerinfektion); auch hier ist eine direkte (überwiegend örtliche) bactericide Wirkung in vivo anzunehmen.

11. Unter bactericider Wirkung verstehen wir dabei immer sowohl Abtötung im engeren Sinne als auch Entwicklungshemmung. Beide sind unserer Ansicht nach nicht wesensverschiedene Vorgänge, sondern gehen ineinander über und lassen sich im Tierkörper in den meisten Fällen überhaupt nicht voneinander trennen.

Verdünnungen der spezifischen Mittel, die auch zur Entwicklungshemmung nicht mehr ausreichen, können sowohl in vitro wie in vivo eine Virulenzabnahme bewirken, auch diese spielt bei der chemotherapeutischen Wirkung zweifellos eine wichtige Rolle.

12. Die genannten Wirkungen der spezifischen Mittel im Tierkörper: Abtötung, Entwicklungshemmung und Virulenzabschwächung der Erreger lassen sich nicht scharf voneinander trennen und dürften in den meisten Fällen nebeneinander bei chemotherapeutischen Heilerfolgen beteiligt sein. Völlig davon zu trennen ist eine Resistenzsteigerung des Organismus durch unspezifische Reizwirkungen. Aus unseren Versuchen ergibt sich kein Anhaltspunkt für die Annahme, daß bei den erzielten therapeutischen Erfolgen eine solcher Reizwirkung beteiligt ist.

---

## Literaturverzeichnis.

*Baumgarten*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **91**, 511. 1921. — *Bier*, Münch. med. Wochenschr. 1921, S. 163. — *Böcker*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. **24**, 7. 1915. — *Böcker*, Biochem. Zeitschr. **103**, 62. 1920. — *Browning* und *Gulbransson*, Bericht von d. Med. Research Committee 1917. Dieselben Proc. Royal Soc. Ser. B. 626, 2. IV. 1918. — *Brunner, von Gonzebach* und *Ritter*, Bruns' Beitr. z. klin. Chirurg. **111**, 572; **125**, 277. — *Ehrlich*, Zeitschr. f. ärztl. Fortbild. 1909. —



*Kolle*, Med. Klinik 1912, Nr. 2. — *Kolle* und *Schloßberger*, Arb. a. d. Inst. f. exp. Therap. 1919, H. 8. — *Langer*, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, S. 1015. — *Morgenroth* und *Ginsberg*, Zeitschr. f. prakt. Augenheilk. 1913. — *Morgenroth* und *Tugendreich*, Biochem. Zeitschr. **79**, 258. 1917. — *Neufeld* und *Schiemann*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. Ref., **57**, 183, Beih. — *Reinhardt*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **95**, 27. — *Roos*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap. **15**, 487. 1912. — *Schilling* und *Böcker*, Dtsch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 25. — *Sachs*, Therap. Halbmonatsh. 1920, S. 379 u. 405. — *Schiemann* u. *Ishiwara*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **77**, 49. 1914. — *Schnabel*, Biochem. Zeitschr. **112**, 112. 1920. — *Schou*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **75**. 539. 1913. — *Starkenstein*, Münch. med. Wochenschr. 1919, S. 205. — *Wright*, Lancet 1912.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität in Budapest [Direktor: Prof. *L. v. Liebermann*].)

# Über Ursache und Bekämpfung einer Typhusepidemie.

Von
Dr. **Julius Freund** und Dr. **Victor Andriska.**

In Miskolcz, einer Stadt von über 60 000 Einwohnern, in der Typhusfälle fast jedes Jahr in größerer oder geringerer Zahl vorkommen, häuften sich solche vom März 1922 angefangen derart, daß an dem Ausbruch einer Typhusepidemie nicht mehr gezweifelt werden konnte. Aufgefordert vom Ministerium für Volkswohlfahrt, die Ursachen dieser Epidemie zu ermitteln und das Geeignete zur Unterdrückung derselben zu veranlassen, wurden wir vom hiesigen hygienischen Universitätsinstitut nach Miskolcz delegiert, wo es uns auch in kurzer Zeit gelang, unsere Aufgabe zu erfüllen. Die Maßnahmen, mit deren Hilfe es gelungen ist, die Epidemie in wenigen Tagen zum Stillstand zu bringen, dürften eine gedrängte Darstellung der ganzen Angelegenheit rechtfertigen.

Wir haben zunächst folgendes festgestellt. Von 1909—1922 wurden in den Monaten März, April und Mai Typhusfälle beobachtet:

| | März | April | Mai |
|---|---|---|---|
| im Jahre 1909 . . . . . | 1 | 1 | 5 |
| „ „ 1910 . . . . . | 2 | 4 | 3 |
| „ „ 1911 . . . . . | 3 | 0 | 0 |
| „ „ 1912 . . . . . | 3 | 1 | 5 |
| „ 1913 . . . . . | 1 | 3 | 1 |
| „ „ 1914 . . . . . | 2 | 4 | 1 |
| „ „ 1915 . . . . . | 2 | 2 | 3 |
| „ „ 1916 . . . . . | 3 | 5 | 3 |
| „ „ 1917 . . . . . | 2 | 0 | 7 |
| „ „ 1918 . . . . . | 5 | 1 | 0 |
| „ „ 1922 . . . . . | 30 | 127 | 135 |

Über die Jahre 1919, 1920, 1921 stehen uns keine Daten zur Verfügung. Immerhin zeigt obige Tabelle, daß im Jahre 1922 in den betreffenden Monaten eine so auffallende Steigerung der Typhusfälle stattgefunden hat, daß es berechtigt ist, von einer Epidemie zu sprechen. Daß es sich wirklich um Typhus gehandelt hat, wurde in vielen Fällen nicht nur klinisch und serologisch, sondern auch bakteriologisch durch Züchtung der Typhusbacillen aus dem Blute festgestellt.







*Trotzdem das massenhafte und explosive Auftreten von Typhus in allen Stadtteilen, die von der Wasserleitung mit Trinkwasser versorgt wurden (an manchen Tagen kamen auch 18 Fälle zur Anzeige) festgestellt wurde* und nur ausnahmsweise einzelne auch in solchen vorkamen, die ihr Trinkwasser aus Hausbrunnen bezogen, es also schon darum wahrscheinlich war, daß man es mit einer Trinkwasserepidemie zu tun habe, haben wir es doch nicht unterlassen nachzuforschen, ob etwa infizierte Nahrungsmittel, besonders Milch und Milchprodukte, Gemüse, Fleisch und Fleischwaren verantwortlich gemacht werden könnten. Von Obst konnte wegen der frühen Jahreszeit noch nicht die Rede sein. Diese Untersuchungen hatten jedoch kein anderes Resultat als das, daß sie den Verdacht in noch entschiedenerer Weise auf das Wasser der Wasserleitung lenkten. Wir möchten noch besonders bemerken, daß die Gemüsegärtnerei, in welcher unreines Wasser, auch Fäkalien führendes Schmutzwasser verwendet wird, schon darum nicht als Ursache angesehen werden konnte, weil die dort erzeugten Gemüse zur Zeit des Auftretens der Epidemie noch nicht in Verkehr kamen und weil unter den dort beschäftigten Arbeitern keine Typhusfälle vorkamen.

Wir haben uns auch bemüht, einen etwaigen Zusammenhang der Typhusfälle untereinander zu ermitteln, aber alle unsere Nachforschungen, bei denen wir, wie überhaupt bei allen unseren Arbeiten von Stadtphysikus Dr. *A. Szabó* aufs eifrigste unterstützt wurden, haben keine Anhaltspunkte für eine Kontaktepidemie ergeben.

Bei der Untersuchung des städtischen Wasserwerkes und der Wasserleitung haben wir, kurz zusammengefaßt, folgendes ermittelt:

1. Das Wasser stammt aus dem sog. Bükk-Gebirge, einem Kalksteingebirge, das zahlreiche, tiefgehende Risse und Sprünge enthält, wie das bei diesem Gestein so häufig vorkommt. Besonders bei heftigen Regengüssen wurde häufig beobachtet, daß das Wasser im Reservoir, das zum Auffangen der Quellen dient, trübe wird, ebenso wie das Wasser aus den Auslaufshähnen.

2. Das soeben erwähnte Reservoir (Sammelbrunnen), aus welchem das Wasser in das Röhrennetz gepumpt wird, ist zwar an und für sich einwandfrei, doch haben wir festgestellt, daß die unmittelbare Umgebung desselben zu Besorgnissen Anlaß gibt, denn wir haben beobachtet, daß beim energischen Auspumpen dieses Sammelbrunnens nicht nur das Wasserniveau innerhalb desselben sinkt, sondern daß auch kleine Tümpel, die sich einige Schritte weit befinden, verschwinden und sich erst wieder mit Wasser füllen, wenn das Pumpen aufhört. Es muß daher eine Kommunikation zwischen dem Brunnen und dem umgebenden Erdreich bestehen, die um so bedenklicher ist, als auch Senkgruben in einer Entfernung von etwa 30 Schritten vorgefunden wurden.



3. Zur Sicherstellung eines konstanten Druckes in der Wasserleitung ist auch bei der Miskolczer Anlage ein Wasserreservoir auf einer höher gelegenen Stelle angebracht. Auch dieses kann zu Bedenken Anlaß geben, da die Verunreinigung des in demselben befindlichen Wassers nicht ausgeschlossen ist. So ist z. B. der flache Deckel dieses Reservoirs dem Publikum (Ausflüglern usw.) zugänglich, und wir fanden Spuren, die diesen Umstand in sehr bedenklicher Weise demonstrierten.

4. Das Hauptdruckrohr, das aus einem nicht ganz einwandfreien Material, nämlich aus Schmiedeeisen hergestellt ist, liegt unter einem Graben an der Seite der Landstraße. Von ungefähr $8^1/_2$ km, die das Hauptdruckrohr durchläuft, sind ungefähr 1,5 km durch Grundwasser immer naßgehaltener Boden. Das Hauptdruckrohr ist fast immer schadhaft und muß jedes Jahr an einigen Stellen ausgebessert werden.

5. Vom Röhrnetz selbst konnten wir nur die Hausleitungen einer näheren Prüfung unterziehen. Wir haben gefunden, daß diese Hausleitungsröhren in zahlreichen Häusern streckenweise in gemauerten Schächten verlaufen, die auch die Abflußrohre der häuslichen Schmutzwasser aufnehmen. Wir haben in Erfahrung gebracht, daß diese Schächte an einigen Stellen infolge Undichtigkeiten dieser Ausflußrohre mit Schmutzwässern derart angefüllt waren, daß die Wasserleitungsrohre mit ihren Absperrhähnen davon bedeckt waren.

6. Die bakteriologische Untersuchung des Wassers, die von verschiedenen Bakteriologen wiederholt ausgeführt wurde, hat nichts anderes ergeben, als daß das Wasser ziemlich viel Keime enthält. Pro Kubikzentimeter 150—670; aber ein konstanter Unterschied zwischen dem Keimgehalt des Sammelbrunnens und dem Wasser, das an den Hähnen entnommen wurde, war nicht festzustellen. Denn einmal war das Wasser des Sammelbrunnens, das andere Mal das Wasser der Hausleitungen keimreicher. In keinem Falle ist es gelungen, im Wasser die Typhusbacillen nachzuweisen. Auch Colibacillen wurden nicht gefunden. Wir möchten jedoch auf diese negativen Befunde kein besonderes Gewicht legen, schon darum nicht, weil wir die Anzahl der Untersuchungen, die vorgenommen wurden, für viel zu gering halten.

Da wir genügende Anhaltspunkte dafür hatten, daß wir es mit einer durch die Wasserleitung verursachten Typhusepidemie zu tun haben und es dringend nötig war, dem Übel abzuhelfen, haben wir uns mit bakteriologischen Untersuchungen nicht weiter abgegeben, sondern überlegt, wie unter den jetzigen Verhältnissen eine schleunige Hilfe möglich wäre. Das Aufkochen des Trinkwassers, das dem Publikum schon vorher auf das eindringlichste empfohlen wurde, wurde nicht, oder nur ausnahmsweise befolgt. Tatsächlich war keine Abnahme der Typhusfälle festzustellen. So hatte denn der eine von uns (*Freund*)





der Stadtverwaltung empfohlen, *das Wasser des Sammelbrunnens durch konstantes Mischen mit Chlorkalklösung* so lange zu desinfizieren, bis für eine Abstellung der Schäden des Wasserwerks anderweitig gesorgt werden kann. Es wurde empfohlen, dem Wasser im Sammelbrunnen so viel Chlorkalk zuzusetzen, daß es konstant *2,5 g Chlorkalk* (*mit 20% aktivem Chlor*) *pro Kubikmeter* enthalten soll.

Dieser Vorschlag wurde angenommen und mit dem Zusatz am 25. V. begonnen. Am 26. enthielt schon das ganze Leitungsnetz gechlortes Wasser. Vom 3. VI. angefangen, also genau 9 Tage nach Beginn der Desinfektion, war die Epidemie erloschen. Denn nachher kamen nur noch ganz vereinzelte Fälle zur Anzeige, welche sicher durch Kontakt in Familien entstanden waren, in denen früher Typhusfälle vorgekommen sind.

Die bakteriologische Untersuchung des desinfizierten Wassers hat ergeben, daß es pro Kubikzentimeter höchstens 12 Keime enthielt, mitunter sogar als steril anzusehen war. Vor der Desinfektion wurden 150—670 Keime gezählt.

Wir wollen noch erwähnen, daß die Kontrolle des richtigen Chlorkalkzusatzes sehr leicht ist, da ein solches Wasser nach Zusatz von Jodkaliumstärkelösung sich sofort bläut.

Wir haben endlich in Erfahrung gebracht, daß sich die Bevölkerung an solches Wasser sehr leicht gewöhnt. Nur ganz frisch aus dem Rohre gelassen, zeigt sehr schwachen Chlorgeruch, der alsbald verschwindet. Der Geschmack erleidet keine Änderung. Irgendwelche Nachteile oder Gesundheitsschädigungen wurden weder vom Publikum noch von den Ärzten beobachtet. Das steht im Einklang mit früheren Erfahrungen, sowohl in Amerika wie in Deutschland. (*J. Gärtner*: Hygiene des Trinkwassers 1915; ferner: *Klut*: Mitteilungen aus der Königl. Landesanstalt für Wasserhygiene in Berlin. Dahlem Heft 17, Berlin 1913.)



(Aus dem Hygienischen Institut der Universität in Budapest.)

# War Fleisch oder Wurst bis zur Tötungstemperatur von Parasiten erhitzt?

Von
**L. v. Liebermann** und **Julius Freund.**

Mit 1 Textabbildung.

Bei Fleischsorten, die im rohen Zustande rot oder rötlich gefärbt sind, ist es leicht zu erkennen, ob sie genügend stark gekocht oder gebraten wurden, um Parasiten aller Art (Finnen, Trichinen, auch die vegetativen Formen von Bakterien) abzutöten, da der rote Muskelfarbstoff sowie der Blutfarbstoff erst bei etwa 70—80° zersetzt werden. Rotes Fleisch wird grau, sog. weißes wie Fischfleisch und die roh rötlich gefärbten Fleischpartien der Hühner, Truthühner usw. fast rein weiß ohne rötlichen Stich. *Geräuchertes und gebeiztes,* oder auch nur gebeiztes Fleisch, das einen Zusatz von Salpeter erhalten hat — die gewöhnliche Art, um dem Fleisch die rote Farbe zu erhalten —, *zeigt aber nach dem Erhitzen keine derartige Farbenveränderung:* es bleibt rot bzw. rötlichweiß.

Es ist also erwünscht, ein einfaches Mittel zu besitzen, welches erkennen läßt, ob ein Fleisch, eine Wurst, bzw. das zu deren Bereitung verwendete Fleisch einer zur Tötung der Parasiten genügend hohen Temperatur ausgesetzt war.

Ein solches einfaches Mittel ist eine Lösung von Wasserstoffsuperoxyd, welches von den in allen tierischen Geweben und Flüssigkeiten, im Blut, im Fett vorhandenen Katalasen unter Gasentwicklung (molekulärer Sauerstoff) schon bei gewöhnlicher Temperatur zersetzt wird. Wird Katalase bzw. die solche enthaltende Substanz auf etwa 80° erhitzt, so wird sie unwirksam.

Übergießt man in einer Eprouvette etwas zerkleinertes Fleisch resp. Wurstinhalt mit einer etwa 3 proz. Lösung von Wasserstoffsuperoxyd und es findet *keine* Gasentwicklung statt, so kann man annehmen, daß es auf eine zur Tötung der Parasiten genügend hohe Temperatur erhitzt und auch nachträglich keiner Verunreinigung ausgesetzt war, die zu einer *massenhaften* Vermehrung von Bakterien geführt hätte, denn auch diese zersetzen das $H_2O_2$.

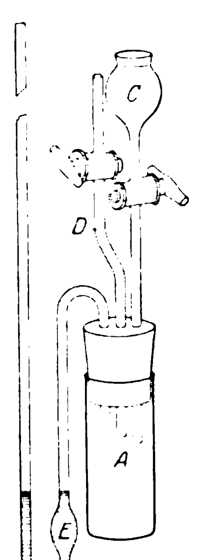
Gegen eine Täuschung, die daher rühren kann, daß aus dem zerkleinerten Fleisch Luftbläschen aufsteigen, die aber gewöhnlich an



Zahl gering sind, schützt man sich durch eine Kontrolle mit destilliertem Wasser.

Findet aber eine beträchtliche Gasentwicklung statt, so kann das Fleisch allerdings genügend hoch erhitzt gewesen sein, aber die Gasentwicklung von nachträglich angesiedelten oder in großer Menge entwickelten Bakterien herrühren. — Für die hygienische Praxis ist auch das wertvoll. Sollte in speziellen Fällen eine Entscheidung nötig sein, ob das eine oder das andere der Fall ist, müßten natürlich anderweitige Untersuchungen vorgenommen werden.

Das soeben geschilderte Verfahren genügt wohl für beiläufige Prüfungen oder orientierende Versuche (eine stürmische oder doch beträchtliche Gasentwicklung macht in der Regel weitere Versuche überflüssig), aber öfters kommt die Gasentwicklung nur langsam in Gang und erreicht nach einiger Zeit (1/4 Stunde oder mehr) doch eine beträchtliche Höhe, so daß es wünschenswert ist, sie zu messen.




Wir haben uns für solche Zwecke einen kleinen, mit gewöhnlichen Hilfsmitteln der Laboratorien leicht herzustellenden Apparat konstruiert (s. Abbildung). Ein 3fach durchbohrter Gummistöpsel verschließt das Entwicklungsgefäß *A*. Eine Bohrung ist für das Quecksilbermanometer *B* mit Millimeterskala, die andere für das kleine mit Gashahn versehene Trichterrohr *C* und die dritte *D* für ein gleichfalls mit Glashahn oder auch nur mit einem Stückchen Kautschuckschlauch und Quetschhahn verschließbares Röhrchen zum Druckausgleich bestimmt. Das Ganze wird in einem Stativ festgeklemmt. Passende Dimensionen, bei Verwendung von etwa 0,5—1 g der fein zerkleinerten Substanz, sind folgende: Höhe von *A* etwa 5 cm. Durchmesser 2 cm. Das Trichterröhrchen *C* soll etwa 5 cm bequem fassen. Der lange Schenkel des Manometers *B* etwa 30 cm lang, mit etwa 2 mm lichter Weite. Der kurze Schenkel etwa 10 cm. Durchmesser der kleinen Kugel *E* etwa 10—12 mm.

Will man größere Mengen als Untersuchungsmaterial verwenden, so wählt man das Entwicklungsgefäß entsprechend größer, etwa einen gewöhnlichen Kolben oder einen Glaszylinder. Wir haben uns aber an die oben angegebenen Verhältnisse gehalten.

Die Ausführung der Versuche ist einfach folgende:

Man zerkleinert auf einer reinen Glastafel mit einem sterilisierten (durch eine Bunsenflamme gezogenen) Messer das Untersuchungsmaterial und bringt dann 0,5—1 g mit einer sterilisierten Pinzette in das Entwicklungsgefäß. Nun wird der mit der beschriebenen Apparatur versehene Gummistöpsel luftdicht aufgesetzt, in den Trichter des



Röhrchens $C$ bei verschlossenem Hahn 3 ccm 3 proz. Wasserstoffsuperoxyd gefüllt, dann das Röhrchen $D$ gelüftet. Nun läßt man das $H_2O_2$ einfließen, schließt dann sofort die beiden Hähne und beobachtet die Gasentwicklung und das Steigen des Quecksilbers im langen Schenkel des Manometers 15 Minuten lang bei Zimmertemperatur (etwa 20°). Bleibt der Stand des Manometers unverändert oder steigt das Quecksilber nur um 1—2 mm, so war das Fleisch oder das Fett oder der Inhalt der Wurst genügend hoch erhitzt, um die Parasiten abzutöten, und hat auch nachträglich keine beträchtliche Verunreinigung mit Bakterien erfahren.

Hätte man die Absicht, auch das Volumen des entwickelten Sauerstoffes zu bestimmen, so müßte man in ähnlicher Weise verfahren, wie das der eine von uns vor längerer Zeit angegeben hat[1]). Für praktische hygienische Zwecke halten wir aber das für unnötig.

In folgendem sollen nun einige Versuche mitgeteilt werden, die sich einerseits auf die spontane Zersetzung des $H_2O_2$, andererseits auf verschiedene und verschieden behandelte Fleischsorten, ferner auf Würste und verschiedene Bakterien, sowie auf den Einfluß von chemischen Konservierungs- und Desinfektionsmitteln auf $H_2O_2$, resp. auf die Wirksamkeit der Katalasen bei Gegenwart solcher Konservierungs- und Desinfektionsmittel beziehen.

### *I. Versuche über die spontane Zersetzung der 3 proz. Wasserstoffsuperoxydlösung.*

Die Lösung allein ohne irgendwelche Zutaten hat keine im Apparate meßbare Gasentwicklung gezeigt. Ein Gemisch von 2,5 ccm $H_2O_2$ und ebensoviel gesättigte Kochsalzlösung gab nach $1^1/_2$ Stunden noch keinen am Manometer meßbaren Ausschlag; erst nach einer weiteren Stunde stieg die Quecksilbersäule um 8 mm.

Wasserstoffsuperoxyd allein oder mit Salz gemischt zersetzt sich also spontan nur in so geringem Maße, daß die Zersetzung für unsere Versuche gänzlich bedeutungslos ist, da, wie weiter unten folgende Versuche beweisen, bei Gegenwart von katalasehaltigen Substanzen, Bakterien mitinbegriffen, schon nach wenigen Minuten oder längstens innerhalb $^1/_4$ Stunde beträchtliche Gasentwicklung stattfindet.

### *II. Versuche mit frischen Fleischsorten.*

Rindfleisch, Schweinefleisch, Pferdefleisch und Fischfleisch zersetzen das Wasserstoffoxyd bei Anwendung von $^1/_4$—$^1/_2$ g so stark, daß eine quantitative Bestimmung in unserem Apparat nicht möglich ist. Hingegen haben wir mit vorher erhitzten Fleischsorten folgende Resultate erhalten.

[1]) Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **104**, 179.

*Rindfleisch* 5 Minuten lang auf 80° (Thermometer im gehackten Fleisch) erwärmt, keine Gasentwicklung.

*Schweinefleisch*, 5—10 Minuten lang auf 80° erwärmt, innerhalb 1/4 Stunde keine Gasentwicklung. Nach 30 Minuten, Manometer nur um 2 mm gestiegen. Dasselbe Fleisch, 5 Minuten auf 90° erwärmt: auch nach längerer Zeit keine Druckzunahme im Manometer.

Da aber die Katalasen in trockenem Zustand gegen Erhitzen widerstandsfähiger sind, wurde Schweinefleisch für einen anderen Versuch vorher im Luftstrom bei Zimmertemperatur ausgetrocknet und erst in diesem Zustand erhitzt. 5 Minuten lang auf 99° erwärmt, hat ein solches Fleisch $H_2O_2$ noch in bemerklicher Menge zersetzt. Auf 110 bis 114° erhitzt, war keine Zersetzung mehr zu beobachten.

*Pferdefleisch* verhielt sich wie Rindfleisch.

*Fischfleisch*: Salzhering, geräucherter Hering verhielten sich ebenso wie die übrigen Fleischsorten, d. h. sie verloren ihre Fähigkeit, $H_2O_2$ zu zersetzen erst nach dem Erhitzen auf 80°.

### *III. Versuche mit auf verschiedene Weise konservierten Fleischsorten.*

Rindfleisch und Schweinefleisch, teils in größeren Stücken, teils aber gehackt, 2—3 Tage geräuchert (auf gebräuchliche Weise in Rauch gehängt), haben ihre katalytische Wirkung auf $H_2O_2$ nicht verloren. Doch ist es mitunter zu beobachten, daß ein solches Räuchern die Katalasewirkung immerhin schwächt. Zusätze von gebräuchlichen Konservierungsmitteln, sowie auch von Salpeter, mit dem Fleischbrei möglichst innig vermischt, vernichten die Katalase nicht, wenn auch hier und da eine Abschwächung erfolgt. Solche Versuche wurden mit Kreosot, Salpeter, salpetrigsaurem Kalium, Borsäure, Salicylsäure, Formalin, schwefligsaurem Natron, Essigsäure und Acetum pyrolignosum ausgeführt, sowie auch mit Zucker. Von salpetersaurem Kalium wie auch von Natriumsulfit wurden zu 50 g gehacktem, frischen Fleisch 2 ccm 1 proz. Lösung zugefügt und nach 18 Stunden auf katalytische Wirkung geprüft. Von den übrigen hier angeführten Konservierungsmitteln kamen verschiedene, relativ große Mengen zur Verwendung, aber nirgends war eine nennenswerte Störung der katalytischen Wirkung zu beobachten. Nur bei der Essigsäure fanden wir eine geringe Verzögerung.

Bei keinem dieser Konservierungsmittel konnten wir, wenn sie allein mit Wasserstoffsuperoxyd zusammengebracht wurden, eine katalytische Wirkung innerhalb der vorgeschriebenen Versuchsdauer beobachten. Es mag übrigens erwähnt werden, daß auch Carbolsäure und Sublimat an und für sich keine katalytische Wirkung ausüben und die Katalasewirkung nicht stören, wenn sie frischem Fleisch in solchen Mengen hinzugefügt werden, wie man sie zu Desinfektionszwecken verwendet.





Aus diesen nur kurz angeführten Versuchen müssen wir schließen, daß die katalytische Wirkung von frischem Fleisch auf $H_2O_2$ nur durch Erhitzen auf etwa 80°, nicht aber durch die gebräuchlichen Konservierungsmittel aufgehoben wird und daß der Zusatz eines jener Konservierungsmittel keine Täuschung in dem Sinne bewirken kann, daß eine Gasentwicklung etwa der Gegenwart dieser Mittel zuzuschreiben wäre.

Es scheint dies in Widerspruch zu stehen mit gewissen älteren Angaben, die in der Literatur zu finden sind. So hat man gefunden, daß Salpeter (auch Sublimat) die katalytische Wirkung wässeriger, katalasehaltiger *Organextrakte* aufhebt. Auch wir haben Ähnliches bei *vollkommen klaren, wässerigen Fleischextrakten beobachtet*. Doch hat das für unsere Zwecke keine Bedeutung, da wir zu unseren Versuchen nicht wässerige Fleischextrakte, sondern zerkleinertes Fleisch selbst verwenden. Bei solchen ist aber eine störende Einwirkung des Konservierungsmittels nicht zu beobachten, auch dann nicht, wenn solche, insbesondere Salpeter, Acetum pyrolignosum, Formalin, Zucker, Kreosot usw. stunden- oder tagelang eingewirkt hatten.

Eine Erklärung für diese Erscheinung dürfte die sein, daß die erwähnten Mittel nur jene Menge von Katalase vernichten, die aus dem Fleisch durch Wasser leicht ausgezogen werden, aber auf jene Mengen nicht leicht wirken können, die in den Zellen eingeschlossen sind, in welche sie allem Anscheine nach nur schwer eindringen.

## *IV. Versuche mit Bakterien.*

Aus den Versuchen mit Bakterien und bakterienhaltigen Materialien geht die übrigens bekannte Tatsache hervor, daß sie allerdings Wasserstoffsuperoxyd zersetzen, daß aber ihre Menge in eben diesen Materialien selbst dann, wenn man für eine genügende Vermehrung sorgt, in der Regel nicht so groß wird, daß die katalytische Reaktion diejenige Intensität erreicht, die man zum Beispiel bei frischem Fleisch beobachtet, wo schon innerhalb weniger Minuten eine so heftige Gasentwicklung stattfindet, daß ein Hahn des von uns beschriebenen kleinen Apparates gelüftet werden muß, um das Herausschleudern des Quecksilbers aus dem Manometer zu vermeiden. Wenn man eine Fleischprobe aufkocht, die nach dem Aufkochen keine wirksame Katalase mehr enthält, 1 Tag in offenem Gefäß bei Zimmertemperatur stehen läßt und dann, wie gewöhnlich, mit $1/2$ g Substanz den Versuch ausführt, so ist noch keine nennenswerte Gasentwicklung zu beobachten, obwohl das Fleisch nicht steril ist; denn wenn es mit einigen Kubikzentimetern sterilen Wassers 1 Tag im Thermostaten gehalten wird, so wirkt es auf $H_2O_2$. Wir haben in 1 Fall nach 20 Minuten langer Einwirkung 1 mm Drucksteigerung beobachtet. Wird mit solchem



Fleisch Bouillon geimpft, so ist reichliche Vermehrung der Bakterien zu konstatieren.

Daß die Bakterien in Mengen, wie sie in Fleisch und Trinkwasser vorkommen, eine relativ nur geringere Wirkung ausüben, geht aus mehreren von uns gemachten Beobachtungen hervor. So hat z. B. ein Trinkwasser, aus dem pro ccm 7500 Kolonien sich entwickelten, in einer Menge von 2,5 ccm angewendet nach 30 Minuten eine Druckdifferenz von nicht mehr als 1,5 mm und erst nach 10 Stunden eine solche von 125 mm gezeigt.

Es ist nicht unsere Absicht, auf die quantitativen Verhältnisse der $H_2O_2$-Katalyse durch die verschiedenen Bakterien näher einzugehen, da solche Versuche in großer Zahl in der Literatur schon vorliegen. Nur um einen Begriff von der Größenordnung solcher Bakterienwirkungen auf $H_2O_2$ zu geben, sei erwähnt, daß z. B. 2,5 ccm einer Suspension von B. coli aus einer 24stündigen Kultur (die 2,5 ccm enthielten $1^1/_2$ Millionen lebender Bakterien) in unserem Apparat nach 15 Minuten nur 1,5 mm Druckdifferenz aufwiesen. Eine frische Staphylokokkenemulsion, die in 2,5 ccm 250 000 Bakterien enthielt, zeigte in derselben Zeit eine Druckdifferenz von 44 mm, nach 35 Minuten 61 mm.

Zeigt also eine Fleischprobe eine beträchtliche Druckdifferenz, so hat man es entweder mit nicht erhitztem Fleisch oder mit bakterienhaltigem oder auch mit solchem zu tun, das nicht erhitzt und bakterienhaltig ist. Zeigt aber ein Fleisch mit $H_2O_2$ innerhalb $^1/_4$ Stunde nur eine ganz unbedeutende Druckdifferenz, so beweist das, daß das Fleisch genügend hoch, mindestens 80° erhitzt war; aber eine Sterilität ist damit nicht nachgewiesen, da es noch lebende Bakterien, besonders Sporen, die katalytisch weniger wirksam erscheinen, enthalten kann.

### *V. Einige Versuche mit Wurstsorten und geräucherten Fleischsorten.*

*Salami*, die bekanntlich aus rohem Schweinefleisch und Speck hergestellt wird und nur kurze Zeit bei niederer Temperatur geräuchert wird, zersetzt das $H_2O_2$ sehr energisch. Drucksteigerung im Apparat beträgt schon in wenigen Minuten 70 mm Quecksilber. Auch rohes geräuchertes *Schweinefleisch* sowie Fleisch von *geräucherten Heringen* verhalten sich ähnlich. Die konservierenden Bestandteile des Rauches vernichten also die Katalase nicht.

*Wurstwaren*, die auf mindestens 80° erhitztes Fleisch enthalten (Preßwurst, Leberwurst, Bratwurst, Pariser Wurst usw.), wirken nicht auf Wasserstoffsuperoxyd. Eine Blutwurst zeigte erst nach 12 Stunden eine Druckdifferenz von 4 mm.

Im Anschluß an diese Versuche sei erwähnt, daß wir auch Versuche mit *Mehl* ausgeführt haben, da solches zur Herstellung von Wurst-



waren vielfach Verwendung findet. Wird Brotmehl nur trocken auf etwa 96° gehitzt, so zeigt ein solches nach 15 Minuten eine immerhin nennenswerte Druckdifferenz von 28 mm. Wird aber das Mehl mit zerkleinertem Fleisch im Verhältnis 1 : 4 gemischt und dieses feuchte Gemisch 5 Minuten auf 85° erwärmt, so ist in der angegebenen Zeit keine katalytische Wirkung zu beobachten. Die Katalase scheint also bei der Gegenwart von Feuchtigkeit gegen das Erhitzen viel weniger widerstandsfähig zu sein.

## *Ergebnis der Versuche.*

Zusammenfassend können wir als Ergebnis unserer Versuche folgendes feststellen:

Findet beim Übergießen von einigen Grammen zerkleinerten Fleisches oder Wurstinhalts mit 3 proz. $H_2O_2$-Lösung in einer Eprouvette sofort kräftige Gasentwicklung statt, so war das Fleisch oder die Wurst nicht genügend hoch erhitzt, um etwa vorhandene Parasiten zu töten.

Wenn unter den geschilderten Versuchsbedingungen ein Fleisch (auch Fischfleisch) oder Wurstinhalt in 3 proz. Wasserstoffsuperoxydlösung verteilt, innerhalb $^1/_4$ Stunde in dem von uns beschriebenen Apparat bei Zimmertemperatur kein höheres Steigen des Quecksilbers im Manometer als 1—2 mm bewirkt, so kann angenommen werden, daß das Untersuchungsmaterial genügend hoch, mindestens auf 80° erhitzt war, daß es also keine lebenden Parasiten, Finnen oder Trichinen, enthält. Auch der Verdacht einer Verunreinigung mit *größeren Mengen* von Bakterien ist auszuschließen, wenn nicht besondere Gründe für einen solchen vorliegen. Wenn das der Fall ist, kann die bakteriologische Untersuchung nicht vermieden werden. Insbesondere hat man auf Sporen zu achten, die ja gegen Erhitzen in der Regel bedeutend widerstandsfähiger sind.

---



# Erfahrungen über die Pest in Transbaikalien.

Von
**Dr. H. M. Jettmar,**
Vorstand der Bakteriologischen Station in Tschita.

Mit 1 Textabbildung.

Im Sommer 1920 leitete ich eine Expedition zur Beaufsichtigung des Tarbaganfellhandels, wobei ich die Möglichkeit hatte, die Nagetierwelt der dahurischen Steppen einem eingehenden Studium zu unterziehen. Als im September dieses Jahres gehäufte Pestfälle unter den Menschen auftraten, welche dann im Winter und Frühling 1921 zu einer großen Lungenpestepidemie in der Mandschurei führten, hatte ich reichlich Gelegenheit, die Pest in ihren beiden Formen, der Beulen- und der Lungenpest, zu studieren.

Zusammengefaßt sind meine Ergebnisse folgende:

1. a) Der endemische Pestherd in Transbaikalien deckt sich ungefähr mit dem Verbreitungsgebiete des dahurischen Murmeltieres, des Tarbagan (Arctomys bobac Pall., vgl. *Radde*, Reisen im Süden von Ostsibirien usw. Bd. I. St. Petersburg. 1862). Fast alle Jahre treten auch unter den Menschen, welche mit diesen Tieren in direktem oder indirektem Kontakt stehen, Pestfälle auf.

b) In diesem endemischen Pestherde sind es namentlich zwei Örtlichkeiten, welche durch ihre gehäuften Epizootien unter den Tarbaganen und Pestfällen unter den Menschen berüchtigt sind, und zwar:

I. Die dahurischen Steppen von Charanor nach Südosten bis gegen die chinesische Grenzstadt Mandschuria sich hinziehend und

II. die Heuwiesen östlich des Flusses Argunj gegenüber Kailastni und Zuruchaitni mit dem Flusse Gan in ihrem Zentrum.

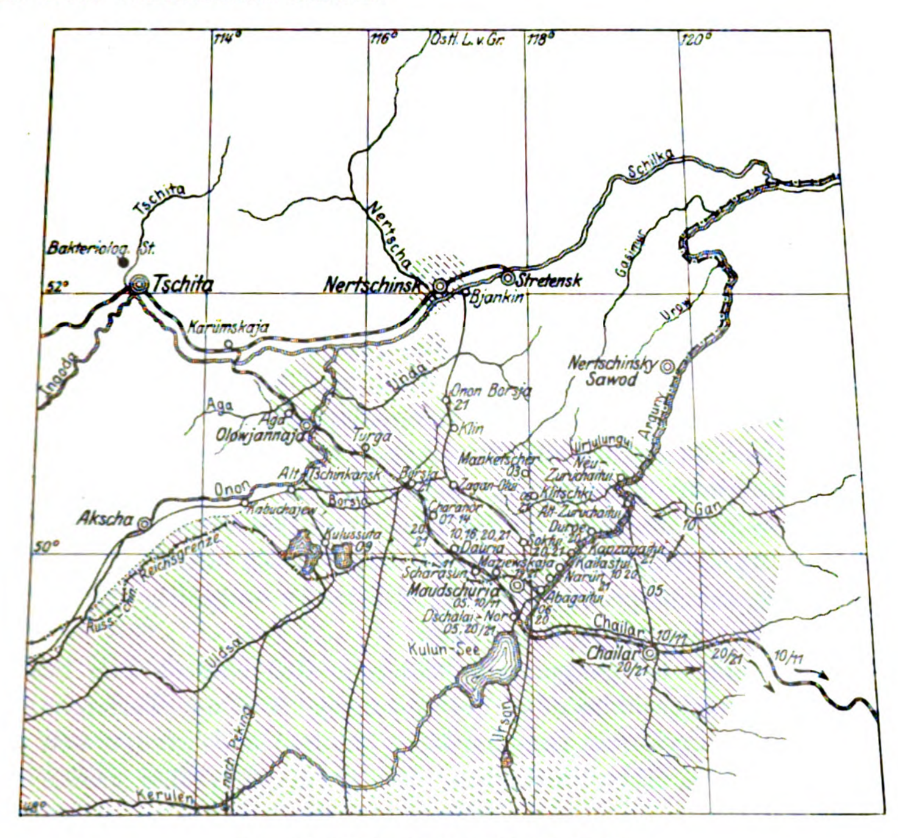
2. In diesen Gebieten sind die ersten Erkrankungsfälle unter den Menschen stets Beulenpest und fallen fast immer in den Spätsommer oder Herbst. Auftreten eines Erstlingsfalles von Menschenpest zwischen Oktober und März (zur Zeit des Winterschlafes des Tarbagan) wurde in Transbaikalien, sowie der angrenzenden Mongolei und Mandschurei niemals beobachtet.

3. Die in Transbaikalien auftretende Beulenpest hat eine Sterblichkeit von 80—90%; primäre Bubonen der Axillar- und Inguinaldrüsen finden sich ungefähr gleich häufig.



4. Die Lungenpest, welche eine Sterblichkeit von *genau* 100% hatte, geht aus der Beulenpest hervor und setzt mehrere (3—4) Passagen von Pestvirus durch den menschlichen Organismus voraus; sie entwickelt sich über den Weg sekundärer Pestpneumonien. Niemals und nirgends wurde ein primärer Lungenpestfall in Transbaikalien beobachtet.

5. Sind einmal unter den Menschen Lungenpestfälle ausgebrochen, dann entstehen weiter ausschließlich Lungenpestfälle, und die Beulenpest tritt vollkommen zurück.




Der endemische Pestherd Transbaikaliens.
Das Besiedlungsgebiet des Tarbagan ist schraffiert. Die Zahlen neben den Ortschaften bedeuten behördlich registrierte Pestausbrüche während der letzten 20 Jahre.

Im Winter 1920/21 wurden in der chinesischen Grenzstadt Mandschuria über 1000 Lungenpestfälle registriert. Während dieser Zeit kam ein einziger Beulenpestfall zur Beobachtung. Derselbe betraf eine Bahnwächtersfrau, welche ein aus Mandschuria kommendes lungenkrankes Weib aufnahm. Als dasselbe durch seinen Bluthusten die ganze Hütte besudelte, wies die Bahnwächtersfrau der Sterbenden die Tür. Das vertriebene Weib wurde unweit des Wächterhäuschens am Bahndamme tot aufgefunden. Obduktionsbefund: Lungenpest. Die

Bahnwächtersfrau wurde beim Reinigen ihrer Hütte angetroffen, an ihrer Hand waren zahlreiche Rhagaden. Nach 5 Tagen erkrankte sie an Beulenpest mit primärem Cubitalbubo, welcher nach dem 6. Krankheitstage aufbrach. Tod am 9. (!) Krankheitstage an Herzschwäche. *Keine* Lungenpest.

6. Die ersten *Lungenpest*fälle treten zu Beginn des Winters auf; die Epidemie hat im Januar-Februar ihren Höhepunkt und erlischt zu Beginn des Frühlings (März-Mai).

7. Die Inkubation der Lungenpest dauerte 3, selten bis 5 Tage. Die längste Inkubationszeit war $5^1/_2$ Tage (1 Fall).

Der Beginn der Lungenpest ist plötzlich mit heftigem Schüttelfrost und Ansteigen der Temperatur bis zu 41° C innerhalb weniger Stunden. (4—6 Stunden nach Beginn des Schüttelfrostes 40,7, 40,4° C. Eigene Messungen.) Schon zu Beginn der Krankheitserscheinungen zeigt die Lunge in einzelnen Lappen Anschoppung von massenhaften Pestmikroben.

In Kyr-Kyra bei Klitschki hatte ich anfangs Februar 1921 Gelegenheit, einen Selbstmörder zu sezieren, welcher sich im Morgengrauen, einige Stunden (3—6) nach Beginn des Schüttelfrostes in Erkenntnis seiner Prognosis pessima erhängte. Massenhaft Pestbacillen im rechten oberen und mittleren Lungenlappen, die linke Lunge war noch frei. In dem rechten unteren Lappen war der Prozeß im Beginne.

Die Krankheitsdauer betrug fast in jedem Falle 3 Tage, konnte aber durch reichliche Gaben großer Dosen von Pestserum bis auf 6 Tage verlängert werden (entsprechend den Ergebnissen während der mandschurischen Lungenpestepidemie 1910/11); der endgültige letale Ausgang ließ sich aber nicht verhindern.

8. Die ersten Lungenpestfälle treten in den chinesischen Städten auf, welche in oder nahe dem Verbreitungsgebiete der Tarbagane gelegen sind (Mandschurei, Dschalai-Nor, Chailar) und werden von dort durch chinesische Arbeiter entlang der Bahn nach dem Süden verschleppt (Zizikar, Charbin, Südchina).

Einer Verbreitung der Lungenpestseuche nach dem *Westen* (Transbaikalien, Tschita, Irkutsk) steht im Wege:

a) die sehr schüttere Bevölkerung Transbaikaliens,

b) die leichte Möglichkeit einer Kontrolle über den einzig wichtigen Verkehrsweg = die transbaikalische Eisenbahn,

c) die zweckentsprechenden Maßnahmen seitens der (russischen) Republik des fernen Ostens: strenge 7tägige Quarantäne im Grenzorte Maziewskaja, 18 km nordwestlich der chinesischen Grenzstadt Mandschuria, militärisch-sanitäre Bewachung der Strecke, ständige Pestorganisation und Pestlaboratorien im gefährdeten Gebiete (Kailastni, Borsja, Tschita).



9. Die Ansteckungen der Menschen mit Drüsenpest (Erstlingsfälle) erfolgen auf 2fache Art:

a) Durch direkte Berührung mit dem erkrankten Nagetiere (Jagd auf Tarbagane durch Erwachsene, möglicherweise auch die Jagd auf Ziesel und kleinere Nagetiere durch Kinder).

Ersterkrankungen an Pest unter Kindern sind in Transbaikalien nicht selten. Da diese häufig mit Schlingen auf kleine Nagetiere Jagd machen, ist die Möglichkeit einer Infektion durch dieselben naheliegend. Auch Erwachsene dürften durch kleinere Nagetiere infiziert werden, wie folgende Anamnese beweist:

Im September 1919 schleppte die Hauskatze des Ehepaars Potschekunin (aus Maziewskaja) ein kleines Nagetier (aller Wahrscheinlichkeit nach einen Zwerghamster), das offenbar schon krank war, auf das Bett, wo sie es zerriß und liegen ließ. Der Kadaver des Nagers blieb einige Stunden auf dem Bette liegen, bis er endlich von der Hausfrau bemerkt und entfernt wurde. 3 Tage nach diesem Vorfalle erkrankten Mann und Frau an tödlicher Bubonenpest.

b) Durch Übernachten in den Steppen zur Zeit der Heumahd auf sog. „Flohweiden". Ansteckung durch blutsaugende Insekten, welche Pestaas verlassen haben.

Bezüglich dieses Infektionsmodus, welcher nach *Dudschenko* in Transbaikalien der häufigere ist, sei hier eine für die Pestausbrüche in jenen Gegenden sehr charakteristische Anamnese mitgeteilt:

Am 28. Juli 1920 begab sich der Kasak Kajukow mit Familie auf die Heuernte am rechten Argunjufer, 40 Werst vom Dorfe Kapzagaitui entfernt. Alle waren zu dieser Zeit gesund. Vor ihnen waren dort auch die Familien S., K. und P., alle aus Kapzagaitui, zur Heuernte eingetroffen. Gleich nach ihrer Ankunft nächtigten sie anfangs bei einer Quelle, doch überzeugten sie sich bald, daß der Platz zum Nächtigen völlig ungeeignet sei infolge der großen Menge von Flöhen, welche hier so zahlreich waren, daß man sie tagsüber häufig im Steppengras springen sah[1]). Die Bauern übersiedelten baldigst auf einen anderen

[1]) Über die Steppenflöhe berichtet *Dudschenko* (Der Pestausbruch in Charanor): „Alle Nager . . . haben zahlreiche Flöhe an sich, von welchen unzweifelhaft einige auf den Menschen übergehen und ihn beißen können. Von letzterem überzeugen uns folgende zwei Umstände: 1. Alle von mir befragten Bewohner Transbaikaliens geben einstimmig zu, daß auf den Heuwiesen die Mäher allsogleich von einer Menge örtlicher „Feld- oder Wiesenflöhe" angefallen werden . . . 2. Charanor wurde während des Pestausbruches anfangs von Kasaken der benachbarten Ortschaft umstellt . . . diese beklagten sich wiederholt, daß die Steppe um Charanor sehr flohreich sei und daß die Flöhe sie belästigten . . ." Nach den Erzählungen zahlreicher von mir befragter Einwohner und auf Grund eigener Beobachtungen kann ich bestätigen, daß die „Steppenflöhe", welche mit den Flöhen der dahurischen Nagetiere identisch sind, häufig und vielleicht auf lange Zeit von ihrem Wirtstiere sich emanzipieren und frei im Steppengrase umherspringen.



Platz, wo ihre Nachtruhe weniger behelligt wurde. Katzen hatte niemand mitgenommen; in ihrer Begleitung befanden sich nur 2 Hunde. Mit der Jagd auf Tarbagane beschäftigte sich niemand. (Nach der Erzählung des S. lagen etwa 3 Werst vom Heuernteplatz entfernt zahlreiche abgehäutete Tarbaganleichen auf einem Haufen beisammen; die Chinesen, welche vor etwa einem Monat auf Tarbagane Jagd gemacht hatten, brachen ungefähr 5 Tage vor der Ankunft der Russen die Jagd ab und zogen fort. Genau in dieser Gegend starben, wie sich später herausstellte, im Sommer dieses Jahres zahlreiche chinesische Tarbaganjäger, und die Überlebenden verschleppten von hier die Seuche nach Chailar und Mandschuria, wo sie sich im Winter zur Lungenpest umgestaltete.)

5—6 Tage nach ihrem Zusammentreffen auf der Heuwiese erkrankte der 18jährige Sohn des P. an typischer Drüsenpest mit primärem Leistenbubo. Er wurde ins Dorf zurückbefördert, wo er nach langem Siechtum unter Vereiterung des Bubo genas; durch ihn erfolgte keine weitere Ansteckung. Gleichzeitig mit P. erkrankte die 13jährige Tochter des Kasaken Kajukow, welche nach 3tägiger Krankheit starb. Die Familie Ka. brach nun die Erntearbeit ab und zog ins Dorf Kapzagaitui zurück. Bald nach ihrer Ankunft erkrankte und starb der Sohn, nach 3 Tagen der Vater, hierauf die zweite Tochter und zum Schlusse die Mutter, so daß das ganze Haus, das von den Dorfbewohnern gemieden wurde, vollkommen ausstarb. Weitere Pesterkrankungen kamen in diesem Dorfe nicht vor.

10. Die Jagd auf Tarbagane mit *Schlingen*, wie sie von den russischen Kasaken und Chinesen allgemein gepflogen wird, ist viel gefährlicher als die Jagd mit dem Gewehre, da kranke Tarbagane in Schlingen viel eher hineingeraten als gesunde, während der mit Flinte ausziehende Jäger den kranken Tarbagan an seinem charakteristischen Gebaren sofort erkennt und meidet.

11. In bezug auf Tarbaganjagd und Pestprophylaxe haben die autochthonen Burjaten weitaus die größte Erfahrung; von ihnen droht die geringste Gefahr. Am gefährlichsten für die Entwicklung der Epidemie sind die aus Südchina zugewanderten Tarbaganjäger, welche infolge ihrer Unkenntnis und Unvorsichtigkeit die Epidemie zum Entstehen und zur Verbreitung bringen; sie verheimlichen und verstecken auch die Pestleichen, um der Anzeigepflicht zu entgehen.

12. Der *Tarbagan* ist Omnivore, tötet und verzehrt kleinere Nagetiere (Pfeifhase, Zwerghamster, Meerschweinchen [eigene Erfahrungen]); er kann dauernd mit Fleisch ernährt werden (Erfahrungen der Tschitaer Veterinärstation, auf welcher monatelang 8 Tarbagane gehalten und mit Fleisch von an Rinderpest gefallenen Tieren gefüttert wurden).



Der Tarbagan besitzt in seinem Bau eigene Gänge, in welche er seine Exkremente, die Leichen der während des Winterschlafes verendeten Tiere und Abfallstoffe aller Art (Felle, Knochen usw.) deponiert. Diese Gänge böten nach *Dudschenko*[1]) die Möglichkeit einer dauernden Konservierung des Pestvirus (absolutes Dunkel, gleichmäßige kühle Temperatur, Feuchtigkeit). Vor Antritt des Winterschlafes reinigt sich der Tarbagan völlig von seinen Ektoparasiten.

13. Die übrigen dahurischen Steppentiere, welche nur von Kindern gejagt werden, dürften ebenfalls bei der Verbreitung der Pest eine Rolle spielen (vgl. Punkt 9). Außer dem Tarbagan wurde noch niemals eine pestkranke Nagetierart in den Steppen gefunden, obwohl alle diese Tiere für die Pest mehr oder weniger empfänglich sind (s. Punkt 21).

Daß es so schwierig, ja fast unmöglich ist, Tierkadaver in den Steppen aufzulesen, findet seine Erklärung in dem massenhaften Vorkommen von Raubvögeln, namentlich Tarbaganadlern (Tarbaschine), welche die Steppe dauernd von Aas reinhalten und denen kranke Tiere allsogleich zum Opfer fallen. Über die Dreistigkeit und Freßgier dieser Raubvögel berichtet *Dudschenko* (*Sibirsky Wratsch* Nr. 17/18. 1915).

14. Die Zwerghamster und dahurischen Zieseln sind Omnivoren und huldigen dem Kannibalismus, die Pfeifhasen sind reine Herbivoren. Alle diese Tiere leben in unmittelbarer Nachbarschaft mit dem Tarbagan, wobei sie nicht selten ihre Gänge in die Tarbaganbauten einbauen.

15. Den Ratten (Mus decumanus s. norvegicus) kommt keinerlei Rolle bei der Entstehung von Pesterkrankungen unter den Menschen in Transbaikalien zu. Die Ratten finden sich in diesem Gebiete überhaupt nur in einzelnen Häusern in Kasakendörfern; mit den Steppennagetieren (Tarbagan) stehen sie in keiner engen Beziehung.

16. Die Ektoparasiten der transbaikalischen Steppennagetiere (soweit sie von mir untersucht werden konnten) sind:

1. Tarbagan, Arctomys bobac Pall:
   - Flöhe: Ceratophyllus Silantiewi Wagner 1898.
   - Läuse: Gattung Polyplax.
   - Zecken: Gattung Rhipicephalus.
2. Dahurischer Steppenwiesel, Spermophilus dahuricus.
   - Flöhe: Ceratophyllus tesquorum Wagner 1898.
   - Läuse: Gattung Polyplax.
   - Zecken: Gattung?
3. Pfeifhase, Ochotoma dahurica:
   - Flöhe: 4 Arten Ceratophyllus.
   - Milben: Gattung Laelaps, Familie Gamasidae.
   - Zecken: Gattung?

[1]) *J. St. Dudschenko* in Wjestnik obschtschestwennoj Gigieny 1915, Nr. 9.





4.—6. Zwerghamster:

4. Cricetulus furunculus:
Flöhe: Neopsylla compar Roths. 1911.
Ceratophyllus spec.

5. Cricetulus griseus?
Flöhe: Leptopsylla pectiniceps Wagner 1893.

6. Cricetulus spec.:
Flöhe: Ceratophyllus spec.

7. Hausmaus, Mus musculus:
Flöhe: Ctenopsylla musculi;
Ceratophyllus fasciatus.
Milben: Gattung Laelaps, Familie Gamasidae.

8. Erdspringhase Alactaga mongolica Radde:
Läuse: Gattung?

Die im Spätherbste und Winter 1920 in Kailastui und Bjankin erbeuteten Ratten waren frei von Ektoparasiten.

17. a) Ceratophyllus Silantiewi Wagner wurde nur auf dem Tarbagan gefunden. Er saugt Menschenblut [*Dudschenko*[1]), *Wu-Lien-Teh*[2]), Erfahrungen der transbaikalischen Tarbaganjäger und Bevölkerung]. Sein Stich ist empfindlich (im Gegensatz zu den Erfahrungen von *Wu-Lien-Teh*). Der Floh findet sich besonders häufig auf jungen Tieren, von welchen bis gegen 100 Stück abgelesen werden können. Sein Lieblingssitz ist der Nacken. Der Tarbaganfloh verläßt das tote Wirtstier bald nach seinem Erkalten (doch konnte ich von einem Tarbagan noch 2 Stunden nach seinem Tode Flöhe ablesen).

b) Die Tarbaganlaus (Polyplax) hält sich nach den Angaben erfahrener Tarbaganjäger (*Sebrjatko* aus Charanor) tagelang im Felle der getöteten Tarbagane und kann dann noch auf den Menschen kriechen, um von ihm Blut zu saugen.

c) Die Frage, ob die Tarbaganzecken Menschenblut saugen, ist noch nicht geklärt.

18. Zieselflöhe (Ceratophyllus tesquorum) finden sich im Juli massenhaft (so konnten von einem Ziesel bis gegen 100 abgelesen werden).

Die Ziesellaus saugt Meerschweinchenblut. Eigene Versuche: Mehrere Ziesselläuse wurden 1 Tag in Eprouvetten liegengelassen und hierauf auf den Nacken von mit Pest infizierten Meerschweinchen, deren Tod innerhalb 12 Stunden zu erwarten war, angesetzt. 6 Stunden nach dem Tode des Meerschweinchens wurden die Läuse wieder abgelesen und die, welche Blut gesogen hatten, zwischen zwei Objektträgern zerdrückt.

*Befund*: Massenhaft Pestbacillen. Erythrocyten : Pestbc. = 1 : 2. Gesamtzahl der im Läusemagen vorhandenen Pestbacillen: gegen 50 000.

[1]) *I. St. Dudschenko*, Wjestnik obschtschestwennoj gigieny 1915, Nr. 9.

[2]) *Wu-Lien-Teh*, Investigations into the relationship of the Tarbagan (Mongolian Marmot) to Plaque. Lancet 2, 529ff. 1913.



*Kontrollversuch*: Vom selben Meerschweinchen wurde nach dem Tode ein leichter Einschnitt in die Haut des Nackens gemacht und das so gewonnene Capillarblut mikroskopisch untersucht. Erythrocyten : Pestbacillen = 30 : 1.

Die Pestbacillen hatten sich demnach im Magen der Ziesellaus außerordentlich rasch vermehrt.

19. Während die in Transbaikalien sich in ungeheuren Massen vorfindenden Zwerghamster im Juli im Durchschnitte gegen 10 Flöhe auf jedem Exemplar beherbergen, sind sie gegen Ende September völlig frei von Ektoparasiten. Die Erklärung ist wohl darin zu suchen, daß die Zwerghamster im Herbste für den Winter in ihren Vorratskammern Artemisia aufspeichern, welche wegen ihres intensiven Geruches seit jeher als flohabwehrendes Mittel gilt. Darin liegt wohl auch der Grund, daß die Steppen Transbaikaliens im Spätsommer, namentlich an einzelnen Stellen von vagabundierenden Flöhen so übervölkert sind (Flohweiden).

20. Die Flöhe der kleineren Steppennagetiere springen sofort ab, sobald das Wirtstier nur ergriffen wird. Läuse, Milben und Zecken bleiben lange resp. dauernd im Fell zurück.

21. Die transbaikalischen Nagetiere wurden auf ihre Empfänglichkeit gegen Pest geprüft. Es ergab sich:

*Tarbagan* und *Ziesel* sind hochempfänglich. Mortalität 100%.

Der *Pfeifhase* zeigt geringere Empfänglichkeit; gegen 50% Mort.

Der *Zwerghamster* besitzt eine noch geringere Empfänglichkeit. Mortalität 25%.

Die Zwerghamster wurden von mir meist subcutan und intracutan geimpft. Bei einigen fanden sich vereiterte Bubonen vor. Die am Leben gebliebenen Hamster verzehrten ungestraft ihre an Pest verendeten Käfiggenossen.

22. Die Sitten und Gebräuche der transbaikalischen Kasaken bei ihren Leichenfeiern (Waschen, festliche Bekleidung und Küssen der Toten durch die ganze Verwandtschaft) tragen zur Verschleppung der Pestseuche bei.

23. Die Tarbaganfelle kommen derzeit undesinfiziert in den Handel.

24. Gegen die *Beulenpest* diente mir bei Sektion und Krankenbesuch als Prophylakticum a) universelle Einreibung des ganzen Körpers mit Bergamottenöl, b) vorherige Desinfektion des Raumes, in welchem der Tote lag, durch japanisches Insektenpulver.

Während der Arbeiten mit *Lungenpest* bekleidete ich mich mit einer allseitig festschließenden trockenen Maske aus Gaze mit Wattezwischenlagen. Bei der Untersuchung Lungenpestkranker legte ich darüber noch einen mit 5 proz. Carbolsäure getränkten Gazewattestreifen, welcher bloß Nase und Mund bedeckte. Die Augen wurden durch Gläser geschützt, an die sich die Maske fest anlegte.

---





(Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie der Universität in Wien [Vorstand: Hofrat Dr. *R. Paltauf*].)

# Über die Erreger des Rauschbrandes der Rinder.

Von
Dr. **St. Ivanič.**

Die zahllosen Publikationen, in denen während des Weltkrieges wie in den ersten Jahren nach demselben die Erreger der anaeroben Wundinfektionen des Menschen bearbeitet wurden, haben nicht vermocht, Klarheit in das verworrene Gebiet zu bringen. Dies hat seine Ursache wohl in erster Linie in der großen Veränderlichkeit der hierhergehörenden Bakterien nicht nur in bezug auf ihre Gramfestigkeit, ihr Aussehen, ihre Sporenbildung, sondern auch im Aspekt ihrer Kulturen und in ihren fermentativen Fähigkeiten. Selbst verschiedene Generationen desselben Stammes zeigen untereinander Verschiedenheiten je nach dem Nährmedium, auf dem sie gezüchtet wurden. Diese große Variationsbreite in morphologischer wie in biologischer Hinsicht hat ja wiederholt zu der irrigen Annahme von der Überführbarkeit der einzelnen Bakterienarten ineinander Veranlassung gegeben. Dazu kommt noch, daß auch in bezug auf die Nomenklatur keine Einigkeit besteht, so daß z. B. ein Autor einen Stamm als „Rauschbrand" bezeichnet, den der andere „beweglichen Butyricus" benennt, während er unter dem Namen „Rauschbrand" Bacillen zusammenfaßt, die von anderen als „Ödembacillen" angesehen werden (vgl. Veröffentlichungen a. d. Geb. d. San.-Wes. Heft 68 u. 71). Der Wert dieser Einteilungen ist um so problematischer, als die kulturellen Eigenschaften dieser Stämme mit ihren serologischen nicht Hand in Hand zu gehen scheinen. So berichtet *Klose* von der Beeinflußbarkeit seines putrifizierenden Stammes $K_{16b}$ durch Seris, die mit nicht fäulniserregenden Stämmen hergestellt worden waren (z. B. Gasödemserum Höchst Op. 3 und Antitoxin vom Stamm Ficker und Berlin). Die Kl-Sera — die mit putrifizierenden Stämmen hergestellt sind — wirkten dagegen auf den $K_{16b}$-Stamm überhaupt nicht ein.

Auf diese große Literatur näher einzugehen, erübrigt sich wohl, zumal da an Übersichtsreferaten und Zusammenfassungen kein Mangel besteht. Es geht aus ihr jedenfalls hervor, daß unter den Erregern des menschlichen „Gasödems" auch Stämme eine Rolle spielen, die



identisch mit den „Rauschbrandbacillen“ der Vorkriegsliteratur sind. Die Sätze, die *v. Hibler* noch in die im Jahre 1912 erschienene zweite Auflage von Kolle-Wassermanns Handbuch schrieb, „die Rauschbranderkrankung spielt in der menschlichen Pathologie keine Rolle. Sie ist eine Erkrankung der Rinder“, lassen sich heute nicht mehr aufrechterhalten. Andererseits aber ist es durch den Vergleich der verschiedenen mit „Rauschbrandstämmen“ hergestellten Sera mehr als wahrscheinlich geworden, daß diese Rinderkrankheit ebenso wie das Gasödem des Menschen durch verschiedene Bakterienarten hervorgerufen werden kann.

Das große praktische und theoretische Interesse, das dem Rauschbrand zukommt, ließ es gerechtfertigt erscheinen, die Frage nach dem morphologischen und serologischen Verhalten resp. der biologischen Zusammengehörigkeit der in unseren Gegenden vorkommenden Stämme aufzurollen. Ich folgte daher gerne der Anregung *Silbersteins*, dies zu tun. Ich ging selbstredend von Stämmen aus, die aus typischem Rauschbrandmateriale gezüchtet worden waren. Einen Teil derselben verdanke ich *Gerlach*, Direktor der Staatlichen Impfstoffgewinnungsanstalt in Mödling, einen anderen hatte *Silberstein* aus eingesandtem Materiale gefallener Tiere[1]) isoliert, und zwei Stämme endlich habe ich aus dem „Rauschbrandimpfstoff“ des Mödlinger Institutes kultiviert.

Wir haben die Stämme zunächst in der üblichen Weise in morphologischer und kultureller Richtung geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle I übersichtlich zusammengestellt. Aus einer genauen Betrachtung derselben ergibt sich, daß die Stämme keine so weitgehenden Unterschiede zeigen, daß man auf Grund derselben ungezwungen eine Differenzierung vornehmen könnte. Nur die beiden aus dem Mödlinger Impfstoff gezüchteten Stämme $JR_1$ und $JR_2$ zeigten im Gegensatz zu den übrigen auf Blutagarplatten einen kleinen hämolytischen Hof. Da sie aber — wie wir später sehen werden — in serologischer und toxikologischer Richtung mit den Stämmen Rb, $R_4$ übereinstimmten, hielten wir uns nicht für berechtigt, sie von diesen abzutrennen. Dies um so mehr, als andererseits gerade die kulturell fast vollständig miteinander übereinstimmenden Stämme Rb und $R_2$ sich toxikologisch-serologisch als Vertreter zweier verschiedener Arten erwiesen. Dazu kommt, daß wir die Nützlichkeit einer auf morphologisch-kulturellen Eigenschaften basierenden Einteilung nicht einsehen konnten, zumal die Fähigkeit, resp. Unfähigkeit, echte Toxine in vitro zu bilden, sich auch bei diesen Stämmen als eine dominante und konstante Eigenschaft erwies.

[1]) In manchen Fällen waren aus dem Materiale des Bac. phlegmonis emphysomatosae (*Fränkel*) Stämme gezüchtet worden. Diese sind nicht in den Kreis der Untersuchungen *Ivanićs* gezogen worden. *Silberstein.*



*Tabelle I*

| Stamm | Begeißelung und Aussehen | Gram | Agar | Gelatine | Milch |
|---|---|---|---|---|---|
| Rb | Peritrich. Polymorph. | In jungen Kulturen durchwegs +, in älter. Kulturen + und —. | Hoch: Kleine, linsenförmige Kolonien, glattrandig. Platten: Flache Kolonien mit arabeskenförmigen Ausläuf. Traubenzucker. Hoch: Starke Gasbildg. Platten: Schleierförmige Kolonien mit gezackt. Rand u. Ausläufern | Schneeflockenähnliche Kolonien, Verflüssigung langsam (10 Tage). Traubenzucker-Gelatine: Verflüssigung unt. stürm. Gasbildung innerhalb 24 Stunden. | Rasche Koagulation (24 Stunden), keine Peptonisierung. |
| $Rb_2$ | Peritrich. Reichl. Granulosebildg. im kohlenhydratreichen Nährboden. | In jungen Kulturen überwieg. +, in älter. Kultur. komm. auch längere Ketten od. Fäden gramnegativer Bacill. vor. | Hoch: Kleine, runde Kolonien, glattrandig, ohne Ausläufer. Platten: Sehr zarte Kolon. mit arabeskenförmig. Ausläufern. Traubenzucker. Hoch: Starke Gasbildung. Platten: Wie Agar | Verflüssigung innerhalb von drei Tagen. | Koagulation innerhalb dreimal 24 Stund., keine Peptonisierung |
| $Rb_4$ | wie Rb | wie Rb | Hoch: Weiße, rundliche Kolonien. Platten und Traubenzucker wie Rb. | wie Rb | wie Rb |
| $Rb_5$ | Wie Rb, von Agarkolonie, sehr lange, gewund. Fäden u. Ketten, Ba gekörnt. | wie Rb | Wie Rb, doch sehr schlecht. Wachstum auf Agar, gut in Traubenzuckeragar. | Keine Verflüssigung (auch nach zwei Wochen). | Keine spontan Koagulat., nur bei Zusatz von Gewebssaft kommt es zur Gerinnung. |
| $Rb_6$ | Zahlreiche z. Teil zu dick. Zöpfen angeordn. Geißeln; schmale, lange Stäbchen. Polymorph. | Vorwiegend + | Hoch: Ovale oder runde scharfrandige Kolonien. Platte: Fein granulierte, ovale Kolonien. | Schneeflockenähnliche Kolonien; langsame Verflüssigung. | Koagulation nach 2—3 Tagen |



*Tabelle I*

| Hirnbrei | Blut | Sporen | Tierpathogenität | Ba a. d. Tierkörper |
|---|---|---|---|---|
| eine Schwär-ng. In den sten 24 Stund. Gasbildung. | Schleierförm. Kolonien mit zahlreich. verschlungenen Ausläufern, keine Hämolyse. | In allen Nährmedien kommt es zu mit dem Alter der Kultur zunehmender Sporenbildung. Sporen endständig od. mittelständig elliptisch. | Kaninchen, Meerschweinchen | Gram +, schlank, einzeln oder zu zweien. |
| wie Rb | wie Rb | In allen Nährmedien endständige Sporen | dgl. | Meist vereinz. oder zu zweit liegend, Gram +, selten kürzere Ketten von 4 bis 6 Gliedern, oft Keulenform, selten Sporen. |
| wie Rb | wie Rb | wie Rb | wie Rb | Längere und kürzere Gram + Stäbchen, manchmal an der Serosa vereinzelt sporulierend. Leberoberfläche auch Scheinfadenbildung. |
| wie Rb | wie Rb | wie Rb | wie Rb | Längere und kürzere Gram + Stäbchen, einzeln oder zu zweien. |
| wie Rb | wie Rb | In allen Nährmedien reichlich kleine end- od. (selten) mittelständige Sporen. | wie Rb | Leber- oder Serosaklatsch: plumpe, große Ba, umgeben von einem ungefärbten ektoplasmatischen Saum. Oft 3—4 Ba in einem Saum. |



*Tabelle I*

| Stamm | Begeißelung und Aussehen | Gram | Agar | Gelatine | Milch |
|---|---|---|---|---|---|
| $Rb_7$ | wie Rb, polymorph; in allen Kulturen auch Fäd. | Meist Gram + | Wie Rb, doch kommen auch in Hochagar Kolonien vor, die Ausläuf. bilden. | Langsame Verflüssigung. | Gerinnung nach 2—3 Tagen. |
| $JR_1$ | Ausgesproch. polymorph, auch in jung. Traubenzukkerkulturen kurze Verbände. | Gram positiv und negativ. | Rundliche Kolonien ohne Ausläufer. | Verflüssigung nach 3 Tagen. | Gerinnung nach 24—48 Stunden, keine Peptonisirung. |
| $JR_2$ | wie $JR_1$ | wie $JR_1$ | Rundliche Kolonien, leichte Verflüssigung des Agars. | Verflüssigung unt. Gasbildung nach 24—48 Std. | Gerinnung nach 24 Stunden, keine Peptonisierung. |

Um möglichst wirksame Gifte zu erlangen, wurde die Virulenz der Stämme zunächst durch Tierpassage (Meerschweinchen) gesteigert. Nachdem wir uns abermals von der Reinheit und Einheitlichkeit der verschiedenen Stämme überzeugt hatten, kultivierten wir sie in verschiedenen Nährmedien. Diese wurden nach wechselnder Bebrütungsdauer auf ihre Toxizität geprüft. Die Stämme wurden eingesät in schmale, hohe Kolben Neutralbouillon, Normalbouillon (= Neutralbouillon + 5 ccm n/1 $Na_2CO_3$-Lösung auf 1 Liter) oder alkalischer Bouillon (= Neutralbouillon + 30 ccm N/1 $Na_2CO_3$-Lösung auf 1 Liter). Der Boden der Kolben war zur Absorption von Sauerstoff mit sterilen Fleischstückchen bedeckt. Zur Bouillon kamen als Zusätze (einzeln wie mehrere gleichzeitig): Pferdeserum, Ascites, 2—5 proz. Traubenzucker, Ca-Lactat, Kreide.

Von den 8 untersuchten Stämmen erwiesen sich 6 als Giftbildner, während von zweien (Stamm $R_2$ und $R_6$) trotz aller erdenklichen Variationen der Versuchsbedingungen kein echtes Toxin zu erhalten war. Wir wollen unser Augenmerk zunächst den Toxinbildnern zuwenden. Aus Tabelle II sind die optimalen Bedingungen für die Giftproduktion ersichtlich. Die Tabelle ist aus den Protokollen mehrerer Versuche zusammengestellt. Die besten Toxine wurden aus alkalischer Bouillon bei Zusatz von Ca-Lactat und von sterilen Fleischstückchen gewonnen. Wie zu erwarten, war die Stärke der von den einzelnen Stämmen gelieferten Toxine nicht die gleiche. Die wirksamsten Gifte pflegte Stamm $Rb_7$ und nach ihm Stamm $JR_2$ zu liefern.



**(Fortsetzung)**

| Hirnbrei | Blut | Sporen | Tierpathogenität | Ba a. d. Tierkörper |
|---|---|---|---|---|
| wie Rb | wie Rb | wie Rb | wie Rb | Einzeln od. zu zweit, fast immer Gram +, selten Blähformen. |
| wie Rb | Schleierförmige Kolonien mit zahlreichen Ausläufern, umgeben v. kleinem hämolytischem Hof. | wie Rb | wie Rb | Leber- und Serosaklatsch und Ödemsaft: neben vereinzelt und zu zweit liegenden Stäbchen, auch kürzere (4—6) und selten längere Ketten und Scheinfäden. |
| wie Rb | wie $JR_1$ | wie Rb | wie Rb | Leber- und Serosaklatsch: sehr lange Fäden. Muskelsaft: Vereinzelt oder zu zweit. |

Die Krankheitserscheinungen, welche die Rauschbrand-Toxine hervorrufen, lassen sich kurz skizzieren, zumal da sie sich in dieser Hinsicht nicht von den Ödemtoxinen unterscheiden. Intravenöse Injektion einer die Dosis letalis nicht allzusehr übersteigenden Giftmenge ruft nach einer mehrere Stunden währenden Inkubation eine Beschleunigung der Atmung und Herzaktion, verbunden mit allgemeiner Unruhe, hervor. Unter immer stärker werdender Unruhe und Dyspnöe tritt der Tod unter Krämpfen ein. Häufig gibt sich das Lungenödem schon prämortal durch stertoröse Atmung und Trachealrasseln zu erkennen. Der Obduktionsbefund ist charakterisiert durch Ödem der Lungen, Hydroperikard und Hydrothorax. Mit großer Regelmäßigkeit findet sich Ödem des Gehirns und seiner weichen Häute sowie passive Hyperämie der parenchymatösen Organe. Bei Meerschweinchen verdienen auch die dunkelroten Nebennieren hervorgehoben zu werden.

Lokal entsteht bei subcutaner Injektion ein wasserklares Ödem rings um die Injektionsstelle, das sich — bei entsprechender Giftdosis — allmählich nach allen Richtungen hin ausbreitet.

Die Analogie zwischen den durch unsere Stämme erzeugten Toxinen und dem Ödemtoxin — sowohl in bezug auf die Entstehungsbedingungen wie mit Rücksicht auf das durch sie hervorgerufene Krankheitsbild bei Kaninchen und Meerschweinchen — war auffallend. Mit großen Erwartungen gingen wir deshalb an die Prüfung, ob und inwieweit das antitoxische Ödemserum des Wiener Serotherapeutischen Institutes imstande ist, dieses neue Toxin zu neutralisieren.



*Tabelle II.*

| | Bebrütungsdauer | | | | | | | Anmerkung |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 · 24 | 2 · 24 | 3 · 24 | 4 · 24 | 7 · 24 | 14 · 24 | 21 · 24 | |
| Neutralbouillon + Fleisch | 0 | 0 | +48 | +72 | 0 | 0 | — | Injiziert wurden je |
| + 5% Traubenzucker | +36 | +36 | +72 | 0 | — | 0 | — | 0,005 ccm Meer- |
| + Ascites | 0 | 0 | 0 | +60 | — | 0 | — | schweinchen von |
| + Pferdeserum | — | 0 | +60 | +72 | 0 | — | 0 | etwa 400 g intra- |
| + Ca-Lactat | 0 | +36 | +24 | +60 | 0 | — | 0 | venös. Die Zahlen |
| + Traubenzucker + Kreide | +30 | +30 | +72 | 0 | — | 0 | — | bedeuten die Stun- |
| + Traubenzucker + Pferdeserum + Kreide | +30 | +30 | +72 | 0 | 0 | — | 0 | den, die zwischen |
| + Ca-Lactat + Pferdeserum | 0 | +36 | +24 | +60 | 0 | — | 0 | Injektion u. Tod des |
| Normalbouillon + Fleisch | — | 0 | +48 | +60 | 0 | — | 0 | Versuchstieres lie- |
| + 5% Traubenzucker | +36 | +36 | +72 | 0 | — | — | 0 | gen. „0“ bedeutet, |
| + Ascites | — | 0 | +48 | +60 | 0 | — | — | daß das betr. Tier |
| + Pferdeserum | — | — | +48 | +60 | +72 | 0 | — | die Injektion über- |
| + Ca-Lactat | 0 | +36 | +18 | +48 | 0 | 0 | 0 | lebte. „—“ bedeut., |
| + Traubenzucker + Kreide | +32 | +36 | +72 | 0 | 0 | — | — | daß d. Tierversuch |
| + Traubenzucker + Pferdeserum + Kreide | +32 | +36 | +72 | +96 | 0 | — | 0 | unterblieben ist. |
| + Ca-Lactat + Pferdeserum | 0 | +36 | +18 | +48 | +84 | 0 | 0 | |
| Alkal. Bouillon + Fleisch | — | — | +48 | +60 | +72 | +120 | 0 | In diesen Versuchen |
| + Traubenzucker | +36 | +36 | +60 | +96 | 0 | — | — | wurden statt Meer- |
| + Ascites | — | — | 0 | 0 | — | 0 | — | schweinchen Ka- |
| + Pferdeserum | — | — | +96 | +84 | 0 | — | — | ninchen von zirka |
| + Ca-Lactat | 0 | +30 | +10 | +24 | +96 | 0 | 0 | 1000 g verwendet. |
| + Traubenzucker + Kreide | +36 | +36 | +60 | +84 | 0 | — | 0 | Injiz. wurde gleich- |
| + Traubenzucker + Pferdeserum + Kreide | +36 | +36 | +48 | +72 | 0 | — | — | falls 0,005 ccm |
| + Ca-Lactat + Pferdeserum | 0 | +30 | +18 | +30 | 0 | 0 | — | intravenös. |



Zunächst wurde Toxin und Antitoxin gemischt injiziert. Zu diesem Zwecke wurden berechnete Toxin- und Antitoxinmengen in vitro gemischt, 15 Minuten im Dunkeln bei Zimmertemperatur aufeinander wirken gelassen und dann injiziert. Aus Tabelle III, die einen derartigen Versuch reproduziert, geht hervor, daß noch 0,001 ccm Serum mehr als 10 letale Toxindosen glatt zu neutralisieren vermögen. Unsere nächste Tabelle (IV) gibt den Auszug aus einem Versuch wieder, in dem Kaninchen 10 letale Dosen Gift intravenös einverleibt wurden, nachdem ihnen tags zuvor 1 ccm antitoxisches Serum unter die Haut gespritzt worden war. Auch hier zeigt sich die Wirkung des Ödemserums auf das Rb-Toxin.

*Tabelle III.* **Toxin — Antitoxin simultan.**

| | Datum 1921 | Stamm | Tier | Toxin | Antitoxin (Gasbrand) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 6. IV. | $IR_2$ | Maus 15 g | 0,01 i.p. | — | † 7. IV. in der Nacht |
| 2 | 6. IV. | $IR_2$ | Maus 16 g | 0,01 s.k. | — | † 7. IV. in der Nacht |
| 3 | 6. IV. | $IR_2$ | Maus 15 g | 0,001 i.p. | — | überlebt |
| 4 | 6. IV. | $IR_2$ | Maus 15 g | 0,001 s.k. | — | überlebt |
| 5 | 14. IV. | $IR_2$ | Maus 16 g | 0,10 s.k. | 0,10 | überlebt |
| 6 | 14. IV. | $IR_2$ | Maus 17 g | 0,10 s.k. | 0,01 | überlebt |
| 7 | 14. IV. | $IR_2$ | Maus 15 g | 0,10 s.k. | 0,001 | überlebt |
| 8 | 14. IV. | $IR_2$ | Maus 15 g | 0,10 s.k. | 0,0001 | † 15. IV. über Nacht |
| 9 | 14. IV. | $IR_2$ | Maus 17 g | 0,01 s.k. | — | † 15. IV. in der Frühe gefund. |
| 10 | 14. IV. | $IR_2$ | Maus 15 g | 0,01 | Tetanusserum 0,20 | † 15. IV. in der Frühe gefund. |

*Tabelle IV.* **Antitoxin-Präventiv-Toxin 10 fache letale Dosis.**

| | Tier | Datum | Stamm | Toxin | Antitoxin (Gasbrand) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Kaninchen 780 g | 3. XII. $10^h$ a.m. | $R_5$ | 0,01 (13 Tage alt. Kult.) i.v. | — | überlebt |
| 2 | Kaninchen 785 g | 3. XII. $10^h$ | $R_5$ | 0,03 i.v. | — | † $5^h$ 25′ p.m. |
| 3 | Kaninchen 800 g | 6. XII. $5^h$ p.m. | $R_5$ | — | 1,0 ccm | |
| | | 7. XII. $11^h$ 10′ a.m. | | 0,30 i.v. | — | bleibt gesund |
| 4 | Kaninchen 1400 g | 7. XII. $11^h$ 10′ a.m. | $R_5$ | 0,30 i.v. | — | † 7. XII. 1920 $2^h$ 45′ n.m. |
| 5 | Kaninchen 815 g | 11. XII. $1^h$ 15′ p.m. | $R_7$ | 0,03 i.v. | — | † nach 72 Stund. |
| 6 | Kaninchen 850 g | 13. XII. $10^h$ 15′ p.m. | $R_7$ | 0,10 (72 St. K.) i.v. | — | 13. XII. $4^h$ 48′ † |
| 7 | Kaninchen 1035 g | 12. XII. $5^h$ p.m. Serum | | | 1,0 ccm | |
| | | 13. XII. | $R_7$ | 0,3 i.v. | | gesund |
| 8 | Kaninchen 1300 g | 14. XII. $12^h$ 35′ | $IR_2$ | 0,01 i.v. (72 Std.) | — | †15. XII. $8^h$ a.m. |
| 9 | Kaninchen 1080 g | 13. XII. $12^h$ 30′ Serum | | | 1,0 ccm | |
| | | 14. XII. $12^h$ p.m. | $IR_2$ | 0,2 i.v. (72 Std.) | | gesund |

*Tabelle V.*

| Meerschweinchen Nr. | Serum Datum | Serum Menge Art | Infektion Datum | Infektion Menge Art | Verlauf | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1120 | 10. V. 2h p.m. | 2 ccm Ödem J.S. s.k. | 11. V. 9h a.m. | 0,1 ccm Ödemsaft i.m. | 12. V. leichte Anschwellung an der Injektionsstelle. 13. V. u. f. glatt. | Ödemsaft stammt von ein. Meerschweinchen, welches am 10. V. abends mit Gehirnkultur vom Stamm Rb intramuskulär infiziert und am 11. V. früh in ultimis getötet worden war. |
| 1121 | 10. V. | 2 ccm Ödem J.S. s.k. | 11. V. 9h a.m. | 0,3 ccm Ödemsaft i.m. | 11. V. mass. Infiltr. 12. V. groß Infiltr. 13. V. † | |
| 1122 | 10. V. | 4 ccm Tet. S. s.k. | 11. V. 9h a.m. | 0,05 ccm Ödemsaft i.m. | 12. V. früh † | |
| 1123 | 11. V. | — | 11. V. 9h a.m. | 0,05 ccm Ödemsaft i.m. | 12. V. früh † | |
| 1240 | 11. V. 10h a.m. | 2 ccm Ödem J.S. | gemischt intramuskulär | 0,1 ccm Ödems. | 12. V. mäß. Infiltr. 13. V. leichte Infiltr. 14. V. u. f. glatt. | |
| 1241 | 11. V. 10h a.m. | 2 ccm Ödem J.S. l. H.E.*. s.k. | 11. V. 10h a.m. | 0,1 ccm Ödemsaft l. H. E.* s.k. | 12. V. mäß. Infiltr. 13. V. dgl. 14. V. glatt. | * l. H. E. = linke hintere Extremität. |
| 1242 | 11. V. 10h a.m. | 4 ccm Tet. J.S. | gemischt intramuskulär | 0,05 ccm Öd. | 12. V. früh † | |
| 1541 | 11. V. 3h p.m.<br>12. V. 7h p.m. | 2 ccm Ödem J.S. i.v.<br>zentralw. v. d. Schwellg. im Gesunden 2 ccm Öd. S.S. i.m. | 11. V. 10h a.m. | 0,1 ccm Öd. i.m. r. H.E. | 11. V. 3h p. m. mäß. hart. Schwellung d. ganz. r. h. Extremität. 12. V. fr. Schwellg. geringr. 12. V. 7h p.m. Schwellung etwas größer. 13. V. Schwellung geringer. 14. V. Schwellung fast 0. 15. V. glatt. | |
| 1542 | 11. V. 3h p.m. | 2 ccm Ödem J.S. i.v. | 11. V. 10h a.m. | 0,05 ccm Ödsaft i.m. r. H.E. | 11. V. 3h p. m. geringe, aber deutl. harte Schwellung d. r. H. E. 12. V. Schwellung fast ganz zurückgegangen. 13. V. fast 0. 14. V. glatt. | |
| 1543 | 11. V. 3h p.m. | 3 ccm Tet. J.S. i.v. 3 ccm Tet. J.S. zentralw. v. d. Schwellung i. Gesunden | 11. V. 10h a.m. | 0,05 ccm Ödsaft r.m. r. H.E. | 11. V. 3h p. m. geringe, aber deutl. Schwellung d. r. H. E. 12. V. früh † | |

Es war nun noch notwendig, die Wirksamkeit des Serums im Infektionsversuch zu prüfen. Da eine auch nur einigermaßen genaue Dosierung anaerober Kulturen fast unüberwindliche Schwierigkeiten bereitet und jedenfalls außerordentlich viel Tiermaterial erfordert, haben wir vor dem eigentlichen Versuch jeweils ein Meerschweinchen durch intramuskuläre Injektion von etwa 0,3 ccm einer gut wachsenden, frischen Gehirnbrei- oder Traubenzuckerkreidefleisch-Reinkultur infiziert. Solche Tiere befanden sich gewöhnlich nach 14—18 Stunden in ultimis und wurden in diesem Zustand durch Nackenschlag getötet. Die bacillenreiche Flüssigkeit aus der Umgebung der Einstichstelle wurde hierauf unter aseptischen Bedingungen entnommen. Dieser Ödemsaft stellt ein sehr virulentes, dabei leicht dosierbares Infektionsmaterial dar, das sich — wie aus Tabelle V ersichtlich ist — als Testobjekt bewährt. Aus diesen Versuchen geht hervor, daß das antitoxische Ödemserum nicht nur bei prophylaktischen und simultanen Injektionen imstande ist, Meerschweinchen vor der Infektion mit unseren toxischen Rb-Bacillen zu schützen, sondern sie auch bei therapeutischer Einverleibung in den ersten Stunden nach der Infektion von dem sicheren Tode zu retten vermag.

Die deutliche Wirkung, die das Serum in diesen Infektionsversuchen entfaltete, ermöglicht auch einen bequemen Vergleich mit den beiden, eingangs erwähnten atoxischen Rb-Stämmen. Wir bedienten uns dabei der gleichen Technik wie in den eben geschilderten Experimenten. Die Resultate dieser Versuche sind in Tabelle VI zusammengestellt. Aus ihnen geht hervor, daß der Krankheitsverlauf nach Infektion mit unseren atoxischen Rb-Stämmen bei Meerschweinchen durch das antitoxische Ödemserum nicht beeinflußt wird. Wir können daraus wohl schließen, daß die atoxischen und die toxischen Rb-Stämme zwei biologisch verschiedene Arten sind, trotzdem wir sie weder kulturell noch morphologisch mit Sicherheit voneinander unterscheiden können.

Bei dem eigenartigen Verlauf der Rauschbranderkrankung unseres Weideviehs, die oft schon wenige Stunden nach dem Auftreten der ersten Symptome zum Tode des befallenen Tieres führt, wird eine Serumtherapie von vornherein wenig Aussicht auf praktische Bedeutung haben. Um so wichtiger dagegen ist die Prophylaxe. Wir haben uns daher bemüht, auf Grund der im vorstehenden skizzierten Erfahrungen, die Bedingungen für eine erfolgreiche Schutzimpfung festzulegen.

Die Vaccination mit toxischen Stämmen gelingt leicht. Wir wählten das bewährte Prinzip der Serovaccination. Als Ausgangsmaterial verwendeten wir 3tägige Kulturen in 2proz. Traubenzucker enthaltender Normalbouillon. Diese Kulturen haben den Vorteil, daß es nicht oder nur in sehr geringem Maße zur Versporung kommt, und daß anderer-

*Tabelle VI.*

| Meerschweinchen Nr. | Serum | | Infektion | | Verlauf | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Datum | Menge Art | Datum | Menge Art | | |
| 620 | 16. V.<br>$2^h$ p.m.<br><br>17. V.<br>$5^h$ p.m.<br><br><br><br><br><br>18. V.<br>$7^h$ a.m. | 3 ccm Öd.<br>Ser. s. k.<br><br>2 ccm Öd.<br>Ser. i. v.<br>3 ccm Öd.<br>Ser. zentralw.<br>v. d. Inf.-St.<br>i.m.<br>3 ccm Öd.<br>S. i.v. | 17. V.<br>$9^h$ a.m. | 0,05 ccm<br>Ödsaft.<br>$Rb_2$ r. H. E. | 17. V. $5^h$ p.m. mäß. harte Schwellung a. d. Infekt.-Stelle. 18. V. früh schwer krank, weichende schwappende Schwellung a. d. r. H. Extr. u. über ganz. Unterbauch. 18. V. $1^h$ p.m. †. | Ödemsaft $Rb_2$: 16. V. abends wurde ein Meerschweinchen m. Gehirnkultur $Rb_2$ infiziert. Das Meerschweinchen wurde am 17. V. früh moribund gefunden, getötet und der Ödemsaft aseptisch entnommen und als Infektionsmaterial verwendet. |
| 621 | 17. V.<br>$9^h$ a.m.<br><br>17. V.<br>$4^h$ p.m.<br>18. V.<br>$7^h$ a.m. | 3 ccm Öd.<br>J. S.<br>Gemischt<br>3 ccm Öd.<br>J. S. i.v.<br>6 ccm Öd.<br>J.S. umspritzt<br>d. ödematös.<br>Partie im<br>Gesunden. | r. H. E. | 0,05 ccm<br>Öd. s. $Rb_2$<br>intramusk. | 17. V. $4^h$ p.m. mäß. harte Schwellung a.d. Infektionsstell. 18. V. früh Befund wie 620. 18. V. $11^h$ 30′ †. | |
| 622 | 17. V.<br>$11^h$ a.m.<br><br><br><br><br>$7^h$ p.m. | 3 ccm Öd.<br>J. S. i.v. 4 ccm<br>Öd. J. S. r. H.<br>E. zentralw.<br>v. d. Infiltr.<br>i. Ges.<br>3 ccm Öd.<br>J. S. i.v. | 17. V.<br>$9^h$ a.m. | 0,05 ccm<br>Öd. J. S.<br>$Rb_2$, r. H.<br>E. i. m. | 17. V. $11^h$ a.m. kleine, kaum merkl. Infiltr. a. d. Injekt.-Stelle, $5^h$ p. m. mäßige Schwellung a. d. r. H. E., 18. V. früh Befund wie 620, $2^h$ p.m. †. | |
| 623 | | | 17. V.<br>$9^h$ a.m. | 0,05 ccm Öds.<br>$Rb._2$ r. H. E. i. m. | Verlauf wie 620. 18. V. $12^h$ mittags †. | |

seits die vegetativen Formen, die sich im Laufe der ersten 24 Stunden außerordentlich stark vermehrt haben, infolge starker Säurebildung aus dem Traubenzucker in ihrer Vitalität stark abgeschwächt werden. Man kann daher bei der Impfung mit relativ sehr hohen Dosen beginnen. So verwendeten wir zur Impfung eines Meerschweinchens eine ganze 3tägige Kultur, die vor der Injektion mit 0,5—1 ccm antitoxischem Ödemserum gemischt wurde. Schon 2 Injektionen genügen, um Meerschweinchen gegen die intramuskuläre Infektion mit mehrfach tödlichen Mengen virulenten Materials (Ödemsaft) zu schützen — wie ein Blick auf Tabelle VII lehrt.

*Tabelle VII.* (Toxische Stämme).

| Nr. | Datum | Tier | Immunisiert mit: lebenden Bazillen 8täg. Traubenzuckerkult. | Immunisiert mit: Gasödem + Immunserum | Immunisiert mit: Impfstoff | Ödemsaft | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 28. II. | Meerschwein. 420 g | ganze Rb-Kult. | 0,50 s. k. | — | — | glatt |
| | 7. III. | | dgl. | 0,30 s. k. | — | — | 8. III. Infiltrat a. d. Injektionsstelle. 11. III. Infiltrat begrenzt, taubeneigroß, teigig. Incision. Eiter. Gram + Stäbchen, auch phagocytierte. |
| | 15. III. | | — | — | — | Rb 0,10 i. m. | überlebt |
| | 15. III. | Kontrolltier 500 g | — | — | — | Rb 0,05 i. m. | † 17. III. in der Frühe aufgefunden. |
| 2 | 20. I. | Meerschwein. 500 g | $R_5$ ganze Kultur | 1,00 s. k. | — | — | 23. I. Infiltrat. 25. I. Durchbruch d. Infiltrat. Eiter mit Gram + Bac., auch phagocytiert. 28. I. Verschorfung. |
| | 27. I. | | dgl. | 0,5 s. k. | — | — | glatt |
| | 8. II. | | dgl. | 0,5 s. k. | — | — | glatt |
| | 18. II. | | — | — | — | 0,20 i. m. $R_5$ | 19. II. Anschwellung d. Oberschenkels. 25. II. glatt. |
| | 18. II. | Kontrolltier 840 g | — | — | — | 0,05 i. m. $R_5$ | † 20. II. in der Frühe gefunden. |
| 3 | 28. II. | Meerschwein. 580 g | $R_4$ ganze Kultur | 1,0 s. k. | — | — | glatt |
| | 7. III. | | dgl. | 0,5 s. k. | — | — | glatt |
| | 15. III. | | — | — | — | 0,20 i. m. $R_4$ | überlebt |
| | 15. III. | Kontrolltier 580 g | — | — | — | 0,05 i. m. $R_4$ | † 16. III. n. m. |
| 4 | 23. II. | Meerschwein. 350 g | $R_7$ ganze Kultur | 0,5 s. k. | — | — | glatt |
| | 1. III. | | dgl. | 0,5 s. k. | — | — | glatt |
| | 9. III. | | — | — | — | 0,20 i. m. $R_7$ | 10. III. Infiltrat. 12. III. glatt. |

*Tabelle VII* (Fortsetzung).

| Nr. | Datum | Tier | Immunisiert mit lebenden Bacillen 8täg. Traubenzuckerkult. | Immunisiert mit Gasödem + Immunserum | Immunisiert mit Impfstoff | Ödemsaft | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | 9. III. | Kontrolltier 500 g | — | — | — | 0,05 i. m. $R_7$ | † 12. III. in der Frühe gefunden. |
| 5 | 9. IV. | Meerschwein. 360 g | ganze Kult. $IR_1$ | 0,5 s.k. | — | — | glatt |
| | 16. IV. | | dgl. | 0,5 s.k. | — | — | glatt |
| | 23. IV. | | — | — | — | 0,20 i. m. IR | 24. IV. Anschwellung. 26. IV. glatt. |
| | 23. IV. | Kontrolltier 500 g | — | — | — | 0,10 i. m. IR | † 24. IV. in der Frühe gefunden. |
| 6 | 9. IV. | Meerschwein. 380 g | ganze Kult. $IR_2$ | 0,5 s.k. | — | — | glatt |
| | 16. IV. | | dgl. | 0,5 s.k. | — | — | glatt |
| | 23. IV. | | — | — | — | 0,20 i. m. $IR_2$ | 24. IV. Anschwellung. 27. IV. glatt. |
| | 23. IV. | Kontrolltier 620 g | — | — | — | 0,20 i. m. $IR_2$ | † 24. IV. in der Frühe gefunden. |

Viel schwieriger erwies sich die Immunisierung gegen die atoxischen Stämme. Wir stellten uns zunächst den Impfstoff her durch 2stündiges Erwärmen einer 3tägigen, gutgewachsenen Traubenzuckerbouillonkultur auf 65°. Mit einer derartigen Vaccine vom Stamme $R_6$ ließen sich auch Meerschweinchen ohne weiteres immunisieren. Anders verhielt sich aber Stamm $R_2$. Noch 0,1 ccm eines solchen Impfstoffes tötete bei subcutaner Injektion ein Meerschweinchen innerhalb von 36 Stunden. Wir versuchten daher die Immunisierung mit keimfreien Filtraten. Zsygmondymembranfilter $X_{48}$ erwies sich als nicht genügend engporig, so daß wir durch $X_{52}$ filtrieren mußten. Diese Filtrate wurden zwar vertragen, doch ließ sich keine nennenswerte Erhöhung der Toleranz gegen Ödemsaft nachweisen. Nachdem auf diesem Wege eine Immunisierung nicht gelungen war, versuchten wir eine Immunität zu erzielen, indem wir Meerschweinchen zunächst 2 Injektionen von $R_6$-Vaccine gaben, dann prüften wir zunächst durch Injektion von 0,2 ccm Ödemsaft eines der Infektion mit dem homologen Stamm $R_2$ erlegenen Tieres, ob eine Immunität gegen diesen sich nachweisen ließ. Da dies der Fall war, wurde nach Ablauf von 8 Tagen eine neuerliche Injektion, und zwar mit 0,1 ccm Ödemsaft eines Tieres, das der Infektion mit Stamm $R_2$ erlegen war, vorgenommen. Das Kontrolltier, das nur 0,05 ccm derselben Ödemflüssigkeit erhalten hatte, war nach 12 Stunden tot, das immunisierte überlebte. Auf diese Weise gelang also auch eine Immunisierung gegen den so außerordentlich virulenten Stamm $R_2$. Aus

*Tabelle VIII.* **Kombinierte Immunisierung.**

| Nummer | Datum | Tier | Immunisiert mit: lebenden Bacillen | Gasödem Antitoxin | Impfstoff | Ödemsaft | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2. IV. | Meerschweinchen | Traubenzuckerkultur $R_5$ | 1,0 s. k. | — | — | glatt |
| | 8. IV. | | dgl. | 0,50 s. k. | — | — | " |
| | 16. IV. | | " | 0,50 s. k. | — | — | " |
| | 23. IV. | | — | — | — | 0,10 $R_4$ i. m. | " |
| | 23. IV. | Kontrolltier | — | — | — | 0,05 $R_4$ i. m. | † 25. IV. in der Frühe gefunden. |
| 2 | 2. IV. | Meerschweinchen | ganze Traubenzuckerkultur $R_5$ | + 1 s. k. | — | — | glatt |
| | 8. IV. | | dgl. | 0,50 s. k. | — | — | " |
| | 16. IV. | | — | — | — | 0,1 ccm $R_5$ i. m. | " |
| | 23. IV. | | — | — | — | 0,10 $R_6$ i. m. | † 24. IV. in der Frühe gefunden. |
| 3 | 28. II. | Meerschweinchen | ganze Traubenzuckerkultur $R_4$ | 0,50 s. k. | — | — | glatt |
| | 7. III. | | dgl. | 1,0 s. k. | — | — | " |
| | 15. III. | | — | — | — | 0,10 Rb i. m. | 16. III. Anschwellung überlebt. |
| | 15. III. abends | Kontrolltier | — | — | — | 0,05 Rb i. m. | † 16. III. in der Frühe gefunden. |
| 4 | 2. IV. | Meerschweinchen | ganze Traubenzuckerkultur $R_4$ | 1,0 s. k. | — | — | glatt |
| | 8. IV. | | dgl. | 0,50 s. k. | — | — | " |
| | 16. IV. | | " | 0,50 s. k. | — | — | " |
| | 23. IV. | | — | — | — | 0,05 $R_2$ i. m. | † 28. IV. in der Frühe gefunden. |
| 5 | 17. III. | Meerschweinchen | — | — | 0,5 s.k. $R_6$ | — | 18. III. Infiltrat 20. III. glatt. |
| | 24. III. | | — | — | 1,0 s.k. | — | glatt |
| | 2. IV. | | — | — | 1,5 s.k. | — | " |
| | 8. IV. | | — | — | — | 0,10 Rb i. m. | † 10. IV. in der Frühe gefunden. |
| 6 | 17. III. | Meerschweinchen | ganze Traubenzuckerkultur Rb | 1,0 s. k. | — | — | 18. III. Infiltrat 22. IV. glatt |
| | 24. III. | | dgl. | 0,5 s. k. | — | — | glatt |
| | 2. IV. | | " | 0,5 s. k. | — | — | " |
| | 8. IV. | | — | — | — | 0,10 $R_5$ i. v. | 9. IV. Infiltrat d. Oberschenk. 10. IV. glatt |
| | 7. IV. | Kontrolltier | — | — | — | 0;05 $R_5$ i. v. | † 9. IV. 2 Uhr n. m. |









diesem Versuch geht implicite hervor, daß eine Immunisierung durch schwächer virulente Stämme gegen höher infektiöse — wenigstens unter den atoxischen Rb-Stämmen — möglich ist.

In einer letzten Versuchsreihe wurde untersucht, ob auch die Vaccination bei toxischen Stämmen eine über die verschiedenen Stämme dieser Gruppe sich erstreckende Immunität gibt. Einige der diesbezüglichen Protokolle sind in Tabelle VIII reproduziert. Die Versuche 1, 3 und 6 derselben zeigen, daß die durch Serovaccination erhaltenen toxischen Ödemstämme auch gegen Stämme der Gruppe schützen, die nicht zur Impfung verwendet worden sind. Dagegen zeigen die Versuche 2 und 4, daß toxische und atoxische Stämme keinen gegenseitigen Impfschutz erzeugen.

## *Zusammenfassung.*

1. Eine Einteilung der aus Rauschbrandmaterial unserer Gegend kultivierten Stämme auf Grund morphologischer oder kultureller Eigenschaften läßt sich nicht ungezwungen durchführen.[1])

2. Auf Grund ihres Vermögens resp. Unvermögens, in vitro echte Toxine zu bilden, ergibt sich eine Einteilung unserer Rauschbrandstämme in eine toxische und atoxische Gruppe.

3. Das von den toxischen Rauschbrandstämmen gebildete Toxin wird durch das antitoxische Ödemserum des Staatlichen Serotherapeutischen Instituts in Wien entgiftet.

4. Dieses antitoxische Ödemserum ist sowohl bei prophylaktischer und simultaner als auch bei rechtzeitig therapeutischer Anwendung imstande, Meerschweinchen gegen die Folgen einer Infektion mit mehrfach letalen Dosen toxischer Ödembacillen zu schützen.

5. Das antitoxische Ödemserum ist wirkungslos gegen Infektion mit atoxischen Rauschbrandstämmen.

6. Durch Serovaccination gelingt es leicht, Meerschweinchen einen weitgehenden Schutz gegen nachfolgende Infektion mit toxischen Rauschbrandstämmen zu verleihen.

7. Gegen atoxische Rauschbrandstämme gelingt eine aktive Immunisierung nur schwer. Uns gelang sie bei Verwendung eines Impfstoffes, der aus wenig virulenten Stämmen hergestellt wurde.

Ich benutze gern die Gelegenheit, Herrn Privatdozenten Dr. *Fritz Silberstein*, Assistenten am Institute, auch an dieser Stelle für seine Unterstützung und Anleitung zu diesen Untersuchungen meinen besten Dank auszusprechen.

---

[1]) Über Untersuchungen mit der von *Zeissler* in Würzburg angegebenen Methodik verfügen wir noch nicht. Wir hoffen dieselben demnächst nachtragen zu können.





## Literaturverzeichnis.

[1]) *Foth*, Die Diagnose des Rauschbrandes. Zeitschr. f. Infektionskrankh., parasit. Krankh. u. Hyg. d. Haustiere **6**, H. 3/4. 1909. — [2]) *Ghon* und *Sachs*, Beiträge zur Kenntnis der anaeroben Bakterien des Menschen. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I Orig., **34**. 1903; **35**. 1904; **36**. 1904; **48**. 1909. — [3]) *Kitt*, Bakterienkunde. 5. Aufl. 1908. — [4]) *Hibler, V.*, Untersuchungen über pathogene Anaerobier. Jena 1908. — [5]) *Hibler, V.*, Rauschbrand. Kolle-Wassermanns Handb. d. path. Mikroorg. Bd. **4**. 2. Aufl. 1912. — [6]) *Kitt, Th.*, Immunität und Schutzimpfungen beim Rauschbrand des Rindes. Kolle-Wassermanns Handb. d. path. Mikroorg. Bd. **4**. 2. Aufl. 1912. — [7]) *Werdt, W.*, Malignes Ödem. Kolle-Wassermanns Handb. d. path. Mikroorg. Bd. **4**. 2. Aufl. 1912. — [8]) *Kitasato*, Über den Rauschbrandbacillus und sein Kulturverfahren. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **6**. 1889. — [9]) *Kitasato*, Über das Wachstum des Rauschbrandbacillus in festen Nährsubstanzen. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **8**. 1890. — [10]) *Kitt*, Der Rauschbrand. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I Orig., **1**. 1887. — [11]) *Schattenfroh* und *Grassberger*, Das Rauschbrandgift. — [12]) *Schattenfroh* und *Grassberger*, Toxin und Antitoxin. — [13]) Veröff. a. d. Geb. d. Mil.-San.-Wesens d. Kgl. preuß. K. M. H. 68 u. 71. — [14]) *Silberstein*, Gasbrand und malignes Ödem. Akad. d. Wissensch. Wien, Mathem.-naturw. Kl. Abt. III. Bd. 127/128. — [15]) *Silberstein*, Gasbrandtoxine und Antitoxine. Wien. klin. Wochenschr. Nr. 52. — [16]) *Zeissler, J.*, Menschliche Wundinfektion und Tierseuche. Zeitschr. f. Infektionskrankh., parasit. Krankh. u. Hyg. d. Haustiere **21**, H. 1. — [17]) *Klose*, Über die Ätiologie und spezifische Behandlung der Gasödemerkrankung. Ergebn. d. Hyg., Bakteriol., Immunitäts-Forsch. u. exp. Therapie **4**. 1920. — [18]) *Weinberg* und *Seguin*, La gangrene gazeuse. Paris 1918. — [19]) *Klose*, Zur Frage der Blutinfektion mit Gasödembacillen bei der Gasödemerkrankung. — [20]) *Markoff*, Vergleichende bakteriologische und serologische Studien über Rauschbrand und Pseudorauschbrand. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I Orig., **1**, 60. 1911. — [21]) *Zeissler*, Über die Reinzüchtung pathogener Anaerobier. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **86**. 1918. — [22]) *Werdt*, Der Gasbrand und seine Erreger. Kolle-Wassermann. — [23]) *Landau*, Untersuchungen über Gasbrand- und Rauschbrandbacillen mit besonderer Berücksichtigung ihres serologischen Verhaltens und ihrer Veränderlichkeit. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I Orig., **79**. 1917.





(Aus der Bayerischen Landesimpfanstalt München.)

# Zur Theorie der Immunität bei Variola und Vaccine.

Von

**A. Groth.**

Theoretische Erörterungen über Entstehung und Wesen der Immunität bei Vaccine und Variola müssen ihren Ausgang nehmen von den grundlegenden Untersuchungen von *Pirquet*, die er vor allem in seinen „Klinischen Studien über Vaccination und vaccinale Allergie" niedergelegt hat. *Pirquet* hat die reaktiven Erscheinungen, welche der Organismus auf die vaccinale oder variolöse Infektion zeigt, mit der Bildung von Antikörpern erklärt, aber nicht nur von solchen, welche das Leben der Mikroorganismen vernichten und damit zur Heilung führen, sondern auch von solchen, welche die klinischen Erscheinungen der Erkrankung hervorrufen, indem sie den Krankheitserreger lösen und aus ihm oder mit ihm toxische Produkte bilden. *Pirquet* versteht unter Antikörpern alle jene Substanzen, welche im Organismus durch die Bekanntschaft mit irgendeiner körperfremden Substanz gebildet werden und als Träger der spezifischen Reaktionsveränderung des Organismus, der „Allergie" zu betrachten sind. Als körperfremde Substanzen, welche zur Bildung von Antikörpern Veranlassung geben, kommen Hüllen- und Inhaltssubstanzen des variolösen bzw. vaccinalen Erregers in Betracht. Es bilden sich Antikörper, die gegen die Hüllensubstanzen gerichtet und vorwiegend lytischer Natur sind, und solche, die gegen die Inhaltssubstanzen gerichtet und vorwiegend antitoxischer Natur sind. Die Hüllenantikörper treten sehr bald, die antitoxischen Antikörper etwas später auf. Damit, daß die Bildung wie auch das spätere Wiederverschwinden der Antikörper gegen die Hüllen- und die Inhaltssubstanzen nicht gleichzeitig und nicht in den gleichen Proportionsverhältnissen erfolgt, erklärt *Pirquet* sowohl den Ablauf der Variola und Erstvaccine als auch die varioloiden bzw. revaccinalen Erscheinungen und die dabei beobachteten Differenzen.

An den grundlegenden Gedankengängen, welche von *Pirquet* durch Analyse der vaccinalen lokalen Erscheinungen in die zwei Prozesse der Entwicklung des Erregers zur Kolonie in der äußeren Haut und der Antikörperbildung des Organismus gewonnen wurden, ist meines Erachtens wenigstens vorerst nicht zu rütteln. Es kann sich nur darum



handeln, in Einzelheiten die *Pirquet*schen Lehren zu berichtigen oder zu ergänzen.

Es ist zweckmäßig, im folgenden ebenso, wie es *Pirquet* getan hat, von den vaccinalen Erscheinungen auszugehen und erst im Anschluß an deren Besprechung die Vorgänge bei Variola und Variolois zu erörtern.

Ohne weiteres darf der Auffassung *Pirquets*, daß die Entwicklung der lokalen Vaccinepustel oder Papille in der Haut dem Wachstum einer Bakterienkolonie auf festem Nährboden vergleichbar ist, beigestimmt werden. Auch hat *Pirquet* durch eingehende vergleichende Untersuchungen über den Beginn und Verlauf der erst- und revaccinalen Erscheinungen genügend begründet, daß zu ihrer Erklärung, im besonderen der Entwicklung der Papille, die Bildung hüllenlösender Antikörper angenommen werden muß, welche dem Virus ermöglichen, sich zu vermehren und seine Wirksamkeit zu entfalten.

Dagegen erscheint die Erklärung *Pirquets* von der Entstehung der vaccinalen Areola mit ihrer Entwicklung und ihren Erscheinungsformen nicht in Übereinstimmung zu stehen. Nach *Pirquet* beginnt die Areola an den Pusteln, nimmt an Umfang zu, hierauf blaßt die Mitte ab. Der äußere Ring bleibt noch heller rot und schiebt sich langsam noch etwas weiter vorwärts. Wenn die Areola auch anfangs fast kreisförmig ist, so entstehen doch bald längere Ausläufer in jener Richtung, welche dem Lymphstrom entspricht. Sie können sich zu lymphangoitischen Streifen ausdehnen, die bis zur Achselhöhle reichen. *Pirquet* ist der Meinung, daß die Hüllenantikörper an der vaccinalen Pustel zur Bakteriolyse eines Teiles der virulenten Elemente führen. Die dabei freiwerdenden Giftstoffe dringen in die Umgebung ein, treffen hier mit den antitoxischen an der Impfstelle abgelagerten Antikörpern zusammen und bewirken mit ihnen die Symptome der Hautentzündung. *Pirquet* sieht in einer Verbindung der antitoxischen Substanzen mit vaccinalen Endotoxinen die Ursache der Areola. Nun entspricht schon die Beschreibung *Pirquets* nicht ganz den tatsächlichen Erscheinungen. Die genaue Beobachtung läßt nämlich erkennen, daß abgesehen von den lymphangoitischen Streifen die areoläre Rötung und Schwellung durchaus nicht immer fast kreisförmig um die Impfpusteln herum sich entwickelt, sondern daß die Ausbildung der Area gegen das Ellbogengelenk zu sehr häufig nicht unwesentlich breiter erfolgt als in der Richtung nach der Schulterhöhe. Namentlich bei der Erstvaccination älterer Kinder und in gleicher Weise auch bei einer bestimmten noch zu besprechenden Form der Revaccination sehen wir diese bei kleineren Kindern häufig nur angedeutete distal gerichtete Entwicklung der Area in auffallender Weise in die Erscheinung treten. Hier geht im Verlaufe des 2. oder 3. Tages des Bestehens der Area ihre Ausbreitung keines-

wegs gleichmäßig nach allen Seiten vor sich, auch nicht in der Richtung des Lymphestroms, sondern ausgesprochen gegen das Ellenbogengelenk zu, also nicht proximal-, sondern distalwärts. Die vorherrschende Richtung, welche die Area dabei verfolgt, liegt in der mehr oder weniger geradlinigen Fortsetzung der Impfstelle an der Außenseite des Oberarmes, dessen Innenfläche, nach welcher die Lymphbahnen gerichtet sind, fast regelmäßig völlig frei bleibt von Rötung und Schwellung. Die Feststellung des Umfangs der Area ergibt stets ihre geringe Neigung, sich über die Schulterhöhe hinaus zu verbreitern, sie findet nach oben meist eine rasche Begrenzung. Dagegen kann sie sich nach unten über das Ellenbogengelenk hinaus bis zum Vorderarm erstrecken. Wir sehen schließlich im weiteren Verlauf die vaccinale Areola in größerer Entfernung von der Impfstelle und von ihr durch eine Zone getrennt, in welcher Hyperämie und Schwellung sich schon wieder ganz oder fast ganz zurückgebildet haben, am distalen Ende des Oberarms oder am Unterarm noch 1 bis 2 Tage bestehen, um dann allmählich abzublassen und zu verschwinden.

Die Auffassung *Pirquets*, daß die Hüllenantikörper sich nicht darauf beschränken, nur die Hüllen des Virus, sondern darüber hinaus auch das Virus selbst zu lösen und so zur Befreiung von Endotoxinen führen, die in das umgebende Gewebe eindringen und die Bildung der Areola veranlassen, ist schon mit der von ihm selbst gegebenen Beschreibung der Areola nicht leicht in Einklang zu bringen. Mit dem Vorwärtsschreiten der Areola in einer dem Lymphstrom entgegengesetzten Richtung ist die Annahme eines Übertritts von Endotoxinen, also chemischer gelöster oder suspendierter unbelebter Substanzen, durch Diffusion aus den Pusteln in das umgebende Gewebe nicht zu vereinen, wenigstens nicht ohne die weitere Annahme, daß infolge des vaccinalen Prozesses der Säftestrom in der Haut und im Unterhautzellgewebe des Armes aus einem im allgemeinen zentripetal gerichteten in einen zentrifugalen sich verwandeln würde. Wir müßten sonst die Möglichkeit für gegeben halten, daß die Endotoxine gegen den Säftestrom zu schwimmen imstande sind. Völlig unverständlich ist es jedoch, auf welche Weise Endotoxine aus den Impfpusteln an Stellen des Armes, die in größerer Entfernung von diesen gelegen und von ihnen durch einen wieder entzündungsfrei gewordenen Zwischenraum getrennt sind, gelangen sollen, um erst dann sich mit den antitoxischen Substanzen zur Bildung der Areola zu vereinigen. Daß Endotoxine überhaupt eine irgendwie entscheidende Rolle im Ablauf des vaccinalen Prozesses spielen und damit zu reaktiven Erscheinungen im Organismus führen sollen, dagegen spricht vor allem auch, daß Schutzpockenlymphe, welche 1 Stunde bei 56° im Wasserbad erwärmt, also möglichst schonend abgetötet ist, Immunität nicht hervorrufen kann.

Wenn es aber nicht unbelebte Substanzen sein können, die durch ihr Zusammentreffen mit spezifischen Antikörpern die Areola hervorrufen, so kann nur der lebende Vaccineerreger selbst die Ursache bilden. Dafür spricht auch eine Reihe zum Teil längst bekannter Tatsachen. Einmal schon die Art der Entwicklung der Areola in der Haut. Es bilden sich von den Pusteln ausgehend nach allen Richtungen hellrote Inseln und Streifen, die sich vergrößern, verbreitern und schließlich zusammenfließen, Vorgänge, wie wir sie in ganz analoger Weise bei dem durch lebende Keime, nämlich Streptokokken, bedingten Erysipel zu sehen gewohnt sind. In allerdings sehr seltenen Fällen intensivster Ausbildung der Areola beobachten wir eine blasenartige Abhebung der Epidermis, welche dem vesiculösen oder bullösen Erysipel vollkommen gleicht. Auch die Schnelligkeit, mit welcher die Areola wandert, entspricht etwa der des Erysipels. Tatsächlich war man gewöhnt, bis zu der von *Pirquet* eingeführten Nomenklatur wegen der auffallenden Ähnlichkeit beider Erscheinungen die Areola als Impferysipel zu bezeichnen, und es würde aus diesen Gründen schon naheliegend gewesen sein, an die Einwirkung lebender Mikroorganismen zu denken. Dabei ist selbstverständlich der von *Pirquet* gebrauchte Name Area oder Areola schon aus äußeren Gründen als zweckmäßiger zu betrachten.

Auch das häufige Auftreten von Nebenpocken, welche sich innerhalb der Arecla namentlich bei hochvirulenter Vaccine entwickeln, ist ein Beweis dafür, daß lebende Keime aus der Pustel in die umgebende Haut einwandern und sich dort bis zur Pustelbildung vermehren, weil die Menge der vorhandenen Antikörper nicht groß genug ist, um ihre Entwicklung zur Kolonie zu verhüten.

Wir wissen ferner aus der Histologie der intracutanen vaccinalen Infiltration beim Kaninchen, daß der Vaccineerreger nicht ausschließlich im mehrschichtigen Epithel, wie bisher allgemein angenommen wurde, sondern auch in den Bindegewebszellen der Haut die Möglichkeit der Vermehrung findet. Wir können demnach auch annehmen, daß in der Areola des Menschen, soweit nicht eine Hemmung durch die Einwirkung der Antikörper erfolgt, die Erreger sich vermehren, ohne daß es in der Epidermis zur Bildung typischer Vaccinepusteln zu kommen braucht.

Mit einer Diffusion von Endotoxinen sind demnach die Erscheinungsformen und der Ablauf der Areola nicht zu erklären, dazu bedarf es der Annahme einer Einwanderung von virulenten Elementen und der Möglichkeit ihrer Vermehrung außerhalb der lokalen Pustel.

Wir müssen daher die bisherige, auch experimentell nicht genügend begründete Auffassung verlassen, daß der lokal inserierte Vaccineerreger gewöhnlich nicht in den Kreislauf übergeht und sich nur an seiner Haftstelle vermehrt, und vielmehr annehmen, daß das Virus nicht nur während der Entwicklung der lokalen Pustel ständig, wenn auch in



kleinen Mengen in den Kreislauf gelangt und zur Antikörperbildung führt, sondern sich auch außerhalb der lokalen Pustel in dem umgebenden Bindegewebe vermehrt.

Wenn wir aber zur Erklärung der Areola die Mitwirkung von Endotoxinen nicht annehmen dürfen, dann kann auch die von *Pirquet* geäußerte Anschauung, daß den hüllenlösenden (plastino- oder chlamydolytischen) Antikörpern gleichzeitig eine lytische Fähigkeit gegenüber den Inhaltssubstanzen des Erregers zukommt, ohne weiteres aufgegeben werden. *Pirquet* hat angenommen, daß ihre Bildung infolge der Einwirkung der Erreger (und deren Stoffwechselprodukte), welche aus der lokalen Pustel in den Kreislauf übertreten, im Knochenmark und der Milz erfolgt. Doch hat er auch die lokale von der Umgebung des Infektionsherdes selbst bewirkte Entstehung der hüllenlösenden Antikörper für möglich gehalten. Für diese letztere Auffassung spricht vor allem, daß wir die ersten Anfänge ihrer Entwicklung in die Zeit der Inkubation zwischen Infektion und Beginn der Ausbildung der Papille, also noch in die ersten 3 Tage des vaccinalen Prozesses verlegen müssen. Mit einer so frühzeitigen Entstehung sind unsere heutigen Kenntnisse über die Größe des Intervalls zwischen Einverleibung des Antigens und Auftreten zentral gebildeter Antikörper nicht zu vereinen.

Das Verständnis der hüllenlösenden Antikörper gewinnt an Klarheit, wenn wir das mit dem Vaccineerreger infizierte Gewebe ausschließlich als ihre Bildungsstätte betrachten und ihnen lediglich die Fähigkeit zuerkennen, die Hüllen des Virus zu lösen und damit dessen infektiöse Wirkung und weitere Vermehrung zu ermöglichen, nicht aber auch das Virus selbst zu lösen und Endotoxine in Freiheit zu setzen. Dabei bleibt noch die Frage offen, ob sich die auf den hüllenlösenden Antikörpern beruhende Zustandsveränderung des Gewebes von der Insertionsstelle des Virus aus auf dem Wege der Blutbahn oder per contiguitatem über die ganze Hautdecke verbreitet. Darauf wird später bei Besprechung des regionär zeitlich ungleichen Auftretens des variolösen Exanthems kurz einzugehen sein.

Die zweite Kategorie der durch den vaccinalen bzw. variolösen Prozeß entstehenden Antikörper ist zentralen Ursprungs — ihre Wirkung äußert sich etwa nach Ablauf von 7 Tagen — und ist im Serum vaccinierter Menschen und Tiere nachweisbar. Sie können nicht als gegen die Endotoxine gerichtete antitoxische, sondern müssen allgemeiner als virulicide Körper aufgefaßt werden.

Wir kommen so zu einer Vereinfachung unserer Vorstellungen über die Art der Einwirkung des vaccinalen Erregers und der durch ihn bedingten reaktiven Erscheinungen, welche uns erlaubt, von der Annahme toxischer an das lebende Virus nicht oder nicht mehr gebundener Substanzen ganz abzusehen. Es würde genügen, nur drei Faktoren



zu unterscheiden: Das Virus, den hüllenlösenden und den viruliciden Antikörper.

Demnach würde sich der Ablauf der Erscheinungen bei der Erstvaccination folgendermaßen darstellen lassen. Das in die Haut eingebrachte Virus übt durch seine als Fremdkörper wirkenden Hüllensubstanzen auf das umgebende Gewebe einen Reiz aus, der zur Bildung hüllenlösender Antikörper führt. Die aus ihrer Hülle befreiten und in ihrer Lebenstätigkeit nicht mehr gehemmten Elemente vermehren sich wie eine Kolonie auf festem Nährboden und erzeugen im Gewebe die lokale Pustel. Von ihr treten frühzeitig, ohne nachweisbare Erscheinungen zu machen, da eine Gegenwirkung durch virulicide Substanzen noch fehlt, lebende Keime durch die Gewebsspalten in die Lymphgefäße und den allgemeinen Kreislauf über und veranlassen in den Zentralorganen der Antikörperbildung, dem Knochenmark und der Milz, die Entstehung virulicider Substanzen, welche vermöge ihrer spezifischen Affinität zu den inzwischen stark vermehrten aus der Pustel in die Umgebung in größerer Zahl austretenden Keimen mit diesen zur Ausbildung der Areola führen. Die Größe derselben hängt einmal ab von der Menge der übertretenden Erreger und damit von der Intensität der Infektion und dann von der Menge der gebildeten viruliciden Substanzen. Wo die Zahl der Erreger zu groß ist, als daß sie von den vorhandenen Antikörpern in kurzem neutralisiert werden können, oder die Bildung der viruliciden Substanzen an sich nicht reichlich und rasch genug vor sich geht, dringen die Erreger weiter in die Umgebung vor und führen zur Ausbreitung der Areola nach denjenigen Richtungen, in welchen ihre Fortbewegung entsprechend den Lymphbahnen am leichtesten möglich ist, oder ihrer Vermehrung durch virulicide Substanzen nur geringer Widerstand entgegengesetzt wird. Hier treffen sie dann mit weiteren, aus der Blutbahn zugeführten viruliciden Antikörpern zusammen und verfallen so schließlich der Vernichtung.

Dafür, daß die Abriegelung der Areola nach oben gegen die Schulterhöhe regelmäßig sehr bald, gegen das distale Ende des Oberarms häufig später und namentlich bei älteren Erstvaccinierten sogar erst mehrere Tage später gelingt, können zwei Erklärungen versucht werden. Man könnte sich einmal vorstellen, daß durch die vorwiegend vertikale Haltung des Armes bei älteren Erst- und Revaccinierten im Zusammenhang mit lokaler durch den vaccinalen Entzündungsprozeß bedingter Stauung der Gewebssäfte die Erreger, welche ihre durch die viruliciden Körper bedingten Verluste durch ständige Vermehrung zu ersetzen suchen, allmählich in distaler Richtung gegen die Hand zu getragen werden. Immerhin ist wegen der gleichmäßigen Verteilung der viruliciden Substanzen im Blut zu erwarten, daß sie bei ihrem Vorwärtsschreiten ständig auf neue virulicide Substanzen im Gewebe



treffen, ohne daß es diesen gelingt, ihre Vermehrung zu verhindern. Denkbar wäre auch, daß das Wandern der Areola seinen Grund in einem geringeren Widerstand hat, welcher distal der Vermehrung des Virus durch virulicide Substanzen erwächst. Während an den dem Stamm nächstgelegenen Teilen des Oberarms die mit dem Blutstrom angeschwemmten viruliciden Substanzen infolge ihrer Affinität zum Virus in einem Maße aus der Blutbahn gezogen werden, welche zur Neutralisierung genügt, reicht die Menge der Antikörper, welche für die weiter distal gelegenen Teile der Extremität noch zur Verfügung bleiben, nicht immer aus, um die weitere Vermehrung des Erregers und damit das Vorwärtsschreiten der Areola zu verhindern. Das Fortschreiten der Areola würde dann um so weniger gehemmt sein, je geringer die Menge der viruliciden Antikörper ist, welche an die weiter distal gelegenen Teile der Extremität gelangen.

Sicher ist jedoch, daß das längst bekannte Wandern der Areola, das wegen der Möglichkeit der Verwechslung mit Erysipel auch praktisch besonderes Interesse beansprucht, nur verständlich zu machen ist, wenn wir den Übertritt nicht von Endotoxinen, sondern von lebenden vermehrungsfähigen Erregern aus den Impfpusteln in das umgebende Bindegewebe zur Annahme machen.

In der Zeit der intensivsten Ausbildung der Areola, in welcher die Erreger in größerer Zahl aus der lokalen Pustel in das umgebende Bindegewebe einwandern, erfolgt auch ein mehr oder weniger gesteigerter Übertritt lebender, von ihrer Hülle befreiter Keime in den arteriellen Blutstrom, aus welchem sie in den Capillaren zur Ablagerung gelangen. Hier werden sie sehr bald als hüllengelöste Keime durch die Einwirkung der viruliciden Antikörper neutralisiert und führen in der Haut zur Bildung der masernähnlichen Flecken, die wir als postvaccinales oder allgemeines Kuhpockenexanthem bezeichnen. Seine Entstehung und Ausdehnung hängt in erster Linie ab von der Menge der in den Kreislauf gelangten Erreger.

Diese Darstellung des erstvaccinalen Prozesses unterscheidet sich von den Theorien *Pirquets* vor allem dadurch, daß ausschließlich dem Erreger, nicht seinen Endotoxinen die Auslösung der reaktiven Erscheinungen zuerkannt wird, daß den hüllenlösenden Antikörpern die Fähigkeit der Lyse gegenüber den Inhaltssubstanzen des Virus abgesprochen und ihre Bildung in das infizierte Gewebe selbst verlegt wird, und weiterhin, daß an die Stelle antitoxischer Substanzen virulicide Antikörper treten.

Zur Erklärung der revaccinalen Erscheinungen genügt es, die drei durch eine Reihe von Übergangsformen miteinander verbundenen Haupttypen derselben kurz zu besprechen: Die Frühreaktion, die beschleunigte Reaktion und die Revaccine mit erstvaccinalem Typus.



Die von *Pirquet* gegebene Darstellung der revaccinalen Formen gründet sich auf seine Annahme, daß die Hüllenantikörper auch den Inhaltssubstanzen des Virus gegenüber lytische Fähigkeit besitzen und daß die den hyperämischen Erscheinungen zugrunde liegende toxische Schädigung auf das Zusammentreffen der vaccinalen Inhaltssubstanzen sowohl mit lytischen als auch mit antitoxischen Antikörpern zurückzuführen ist. Wie die Entwicklung, so vollziehe sich auch die Rückbildung der beiden vaccinalen Antikörper nicht gleichmäßig, so daß unter Umständen im Organismus noch Hüllenantikörper vorhanden sein können, während die antitoxischen Substanzen schon fehlen. Die im vorhergehenden entwickelten gegenüber den Auffassungen von *Pirquet* vereinfachten Vorstellungen erlauben, eine Reihe von Erscheinungen bei der Revaccination wesentlich ungezwungener zu erklären, weil sie die den beiden Antikörpern zugeteilten Aufgaben vollkommen trennen.

Die erneute Infektion führt zur Frühreaktion, wenn die hüllenlösende Fähigkeit des Gewebes noch ungeschmälert vorhanden ist, und die viruliciden Substanzen ebenfalls in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen. In diesem Falle ist zwar durch den hüllenlösenden Antikörper die Entwicklung des Erregers an sich ermöglicht, aber durch die rasch einsetzende Wirkung der viruliciden Substanzen sehr bald gehemmt. Die Frühreaktion ist als Produkt der Einwirkung der viruliciden Substanzen auf die durch die Hüllenantikörper befreiten Erreger eine der Areola analoge Erscheinung. Eine irgendwie nennenswerte Vermehrung der Erreger an der Infektionsstelle, ihre Resorption und damit auch eine Steigerung der Immunität ist dabei nicht zu erwarten.

Die beschleunigte vaccinale Reaktion sehen wir dann, wenn die hüllenlösenden und ebenso die viruliciden Antikörper zwar nicht mehr als solche vorhanden sind, aber die Bereitschaft zu ihrer Neubildung in höherem oder geringerem Maße im Organismus noch gegeben ist, also nur eine relative Insuffizienz der Antikörper besteht. Hier kommt es unter der rascheren oder langsameren Wiedergewinnung der hüllenlösenden Fähigkeit des Gewebes zu beschleunigter Entwicklung, dann durch die Einwirkung der viruliciden Substanzen zu mehr oder weniger frühzeitigem Stillstand und Rückbildung der Papille und in deren Umgebung zu geringeren oder intensiveren hyperämischen Erscheinungen. Die Ausbildung der letzteren hängt einerseits davon ab, in welchen Mengen der Erreger in die Umgebung der Papille überzutreten imstande ist, und andererseits von der Fähigkeit des Organismus zur Neubildung virulicider Substanzen. Eine über den augenblicklichen Bedarf hinausgehende Neubildung derselben und damit die Steigerung der abgeschwächten Immunität ist sicher dann zu erwarten, wenn den



Erregern in einigermaßen ausreichendem Grade die Möglichkeit des Übertritts in den Kreislauf gegeben ist.

Die dritte Form der Revaccine, die Revaccine mit erstvaccinalem Typus wird vorwiegend bei Individuen mit starker oder völliger Einbuße der Fähigkeit zur beschleunigten Neubildung sowohl der hüllenlösenden als auch der viruliciden Substanzen beobachtet. Die Papille zeigt eine der Erstvaccine im wesentlichen entsprechende Entwicklung sowohl in der Art ihrer Ausbildung als auch in ihrem zeitlichen Ablauf, läßt jedoch fast stets, wenn auch mitunter nur andeutungsweise, den allergischen Charakter erkennen. Die Area sehen wir gewöhnlich in der gleichen Weise nur meist frühzeitiger beginnend als bei älteren Erstvaccinierten sich entwickeln. Auch bei größter Ausdehnung bleibt sie stets proximal gegen die Schulter zu auf die unmittelbare Umgebung der Impfstelle beschränkt, während sie sich distal nicht selten bis zum Vorderarm und über denselben hinaus bis zur Hand erstreckt. Sie kann in der Umgebung der Pusteln schon völlig abgeblaßt sein, aber noch weiter in mehr oder weniger breitem Streifen über den Vorderarm wandern. In diesem Verhalten der Areola der Revaccinierten mit ihrem ständigen Nachschub viruli̇cider Substanzen, der nur durch deren Neubildung erfolgen kann, liegt zugleich die einfachste Widerlegung der Auffasssung von *Jürgens*, daß die Revaccination nur als eine Immunitätsreaktion, was sie selbstverständlich ebenfalls ist, nicht als Schutzimpfung betrachtet werden kann.

Bei der Revaccine mit erstvaccinalem Typus läßt sich nicht selten erkennen, daß zwar die Papille in Entwicklung und Aussehen völlig dem erstvaccinalen Typus gleicht, daß die Area jedoch frühzeitiger einsetzt als wir bei der Erstvaccine zu sehen gewohnt sind. Demnach würde unter Umständen der Organismus seine hüllenlösende Bereitschaft schon zu einem Zeitpunkt vollständig eingebüßt haben, zu welchem seine Fähigkeit zu beschleunigter Neubildung virulicider Substanzen noch nicht geschwunden ist.

Eine besondere Form der Revaccine, welche trotz ihres durchaus nicht seltenen Auftretens bisher nicht beschrieben wurde, bildet die Revaccine petechialis. Sie gehört nach der Art ihrer Erscheinungen fast ausschließlich in die Gruppe der beschleunigten vaccinalen Reaktion, wenn sich auch Übergänge zur Frühreaktion einer- und zur Revaccine mit erstvaccinalem Typus andererseits finden. Die Papille zeigt beschleunigte Entwicklung, frühzeitigen Stillstand und Rückbildung, nicht selten eine eigenartige graurötliche Färbung, die Area jedoch nicht nur die gewöhnliche entzündliche Rötung und Schwellung, sondern innerhalb derselben kleine, mitunter sehr zahlreiche, deutlich als solche erkennbare Blutungen. Durch die qualitative Steigerung der Hyperämie zu Blutextravasaten kennzeichnet sich die



Revaccine petechialis als hyperergische Modifikation des vaccinalen Prozesses.

*Pirquet* hat den Begriff der hyperergischen Reaktion einmal auf die besonders beschleunigte und verstärkte Frühreaktion, welche bei hochvirulenter Lymphe entsteht (hyperergische Frühreaktion) und dann auf die Fälle von Revaccine mit erstvaccinalem Typus in Anwendung gebracht, bei welchen sich die areolaren Erscheinungen in ausgedehntem Maße entwickeln. Abgesehen davon, daß in diesen letzteren Fällen auch sehr ausgedehnte areolare Erscheinungen nicht ohne weiteres als allergische betrachtet werden dürfen, da sie in gleicher Weise auch bei der Erstvaccination älterer Kinder zur Beobachtung gelangen, entspricht dem eigentlichen hyperergischen Begriff viel eher der exzessive Ausfall der Reaktion nach der qualitativen Seite hin, wie er in der Revaccine petechialis durch das Auftreten von Blutextravasaten gegeben ist. Es ist daher die Revaccine petechialis als die hyperergische vaccinale Reaktion zu bezeichnen. Die bis zum Auftreten von Blutungen gesteigerte Läsion der Gefäßwände darf auf eine besonders intensiv einsetzende und daher in gesteigertem Maße toxisch wirkende gegenseitige Bindung des Virus und der neu sich bildenden viruliciden Antikörper des reinfizierten Organismus zurückgeführt werden. Damit steht in Einklang, daß auch bei sehr ausgeprägter Entwicklung der erstvaccinalen Areola nach deren Rückbildung zu erkennen ist, daß feinste Blutextravasate in die Haut erfolgt sind. Die bei der Revaccine petechialis entstandenen Blutungen sind jedoch größer und treten dem Charakter der beschleunigten Reaktion entsprechend wesentlich früher und deutlicher in die Erscheinung.

Die theoretischen Vorstellungen, welche von *Pirquet* für die vaccinale Infektion entwickelt wurden, hat er selbst auf den Krankheitsverlauf bei Variola und Variolois wenigstens in den Hauptzügen zu übertragen versucht, dabei jedoch einige nicht geklärte, zur Beurteilung der Erkrankung immerhin wichtige Vorgänge unbeachtet gelassen. Tatsächlich begegnet die Verwertung auch der im vorhergehenden gegenüber den ursprünglichen Auffassungen *Pirquets* etwas vereinfachten Theorien gewissen Schwierigkeiten, weil wir es bei der variolösen nicht wie bei der vaccinalen Infektion mit Erscheinungen zu tun haben, deren willkürliche Erzeugung uns jederzeit möglich ist und die durch ihre vorwiegende Lokalisierung in der äußeren Haut zum großen Teil einer unmittelbaren Besichtigung zugänglich sind.

Von der vaccinalen unterscheidet sich die variolöse Infektion durch die Dauer der Inkubation. Bei der Erstvaccine vergehen von der Infektion bis zum Auftreten der sichtbaren lokalen Erscheinungen nur annähernd 3 Tage, bei der Variola und Variolois bis zum Ausbruch der Erkrankung 13—14, und bis zum Erscheinen der sichtbaren lokalen

Veränderungen weitere 2—3, also im ganzen etwa 16 Tage. In diesem wesentlich verschiedenen Verhalten der Inkubation ist es begründet, daß wir auch jetzt von der hypothetischen Protopustel *Pfeiffers* nicht absehen können. Wir nehmen an, daß das Variolavirus auf die Schleimhaut der oberen Luftwege oder der Rachenorgane gelangt, hier ohne klinisch feststellbare Erscheinungen zu machen, sich vermehrt und nach Ablauf von 14 Tagen in den arteriellen Kreislauf gelangt. Als Voraussetzung für die Vermehrung des Virus in der Protopustel müßte ebenso wie bei der Vaccine die Entstehung hüllenlösender Antikörper gelten, deren Bildung jedoch anscheinend später erfolgt als bei der vaccinalen Infektion.

Von der unter dem Einfluß der hüllenlösenden Antikörper gebildeten Protopustel treten schon 2—3 Tage vor Beginn der Erkrankung kleinste Mengen von Virus in den Kreislauf über und führen in einzelnen Fällen zu geringgradigen Störungen des Allgemeinbefindens, die als Prodrome bezeichnet werden. Der eigentliche plötzliche Krankheitsbeginn ist hervorgerufen durch den Einbruch der inzwischen in der Protopustel massenhaft vermehrten Erreger in den arteriellen Kreislauf, aus welchem sie sich nach Auffassung von *Pirquet* unter der Einwirkung von Agglutininen nach Art eines embolischen Prozesses in den Capillaren festsetzen. Für die Annahme einer Agglutination sind jedoch die von *Pirquet* angeführten Gründe nicht stichhaltig genug. Vor allem ist nicht einzusehen, warum die vermeintliche sofort sehr intensiv einsetzende Wirkung der Agglutinine wesentlich früher erfolgen soll als die der viruliciden Substanzen, die erst etwa 7 Tage später in volle Wirksamkeit treten, selbst wenn wir mit *Pirquet* die ersten Anfänge ihrer Bildung ebenso wie die der viruliciden Antikörper vor Ausbruch der Erkrankung in die letzten Tage der Inkubation (Prodromalstadium) verlegen. Dagegen würde es naheliegen, die Ablagerung der Variolakeime in den Capillaren mit Vorgängen in Verbindung zu bringen, die wir bei parenteraler Einverleibung artfremden Eiweißes beobachten können. Blutuntersuchungen nach intravenöser, subcutaner und intracutaner Injektion von artfremdem Serum haben bei Kaninchen ergeben, daß 10 Minuten nach der Injektion aus dem venösen Blut die polymorphkernigen Leukocyten entweder vollkommen oder fast völlig verschwunden sind, also infolge der einverleibten Eiweißmoleküle und, wie wir annehmen dürfen, mit ihnen im capillaren Kreislauf zurückbleiben. In ganz ähnlicher Weise können wir uns ohne Zuhilfenahme von Agglutininen lediglich unter Mitwirkung der polymorphkernigen Leukocyten die Ablagerung der variolösen Erreger in den Capillaren vorstellen.

Die initialen Exantheme, die in unmittelbarem Anschluß an den Einbruch der Erreger in den arteriellen Kreislauf, gewöhnlich am



2. Tage des Initialstadiums beobachtet werden und rasch wieder verschwinden, dürfen in gleicher Weise wie die vaccinalen hyperämischen Erscheinungen lokaler oder allgemeiner Natur auf ein Zusammentreffen von hüllengelösten Variolakeimen mit viruliciden Substanzen zurückgeführt werden. Es handelt sich hier um die geringen Mengen virulicider Antikörper, welche schon während der Entwicklung der Protopustel, also noch innerhalb der Inkubationszeit sich gebildet haben. Die relative Seltenheit der *initialen* Exantheme gerade bei Variola vera sind ein Beleg dafür, daß sich zentral gebildete Antikörper erst nach dem massenhaften Einbruch der Erreger in die Blutbahn in ausreichendem Maße entwickeln.

Das eigentliche Blatternexanthem ist, so einfach auch seine Deutung als neuerliche Kolonie des Erregers im Gewebe erscheint, in den Einzelheiten seiner Entstehung und Ausbreitung bisher nicht in genügendem Maße klargelegt worden. Schwierigkeiten bereitet vor allem die Tatsache, daß das Exanthem nicht sofort, sondern erst gegen Ende des 3. Tages beginnt, und daß es auch dann nicht, der gleichmäßigen Aussaat des Erregers über den Körper entsprechend, gleichzeitig auf der ganzen Hautoberfläche erscheint, sondern daß seine Ausbreitung innerhalb der nächsten 2—3 Tage meist in einer ganz bestimmten Reihenfolge sich vollzieht. Die ersten Pockeneruptionen erscheinen auf der Schleimhaut des Mundes und des Rachens und fast gleichzeitig auf der Haut der Stirne, der Nase und der Oberlippe, dann ergreift das Exanthem den übrigen Teil des Gesichtes und den behaarten Kopf, um weiterhin den Rücken, die Brust, die Arme, nachher den Leib und zuletzt Unterschenkel und Füße zu befallen. Auf den Schleimhäuten erfolgt die Pockeneruption in derselben Zeit wie auf der benachbarten äußeren Haut.

Als sicher darf gelten, daß die aus der Protopustel in den arteriellen Kreislauf eingedrungenen Keime innerhalb weniger Minuten, und zwar gleichzeitig in alle Teile des Körpers gelangen, daß also der Erreger nicht erst einige Tage im Blute kreist und dann die einzelnen Teile des Körpers nacheinander befällt. Der Entwicklung des Erregers zur Kolonie, als welche wir die einzelne Pockenpustel auffassen müssen, geht demnach eine neuerliche mehrtägige Inkubation voraus, die wir nur dadurch erklären können, daß die Variolakeime vielleicht unter dem Einfluß der polymorphkernigen Leukocyten sich wiederum mit Hüllensubstanzen umgeben, aus denen sie durch lytische Antikörper erneut befreit werden müssen.

Bis zum Auftreten der Pockenpusteln in der Haut der unteren Extremitäten vergehen 5 Tage, die Inkubationsdauer beträgt also um wenigstens 2 Tage mehr als bei der vaccinalen Infektion. Damit steht in Einklang, daß auch die Entwicklung der hypothetischen Proto-



pustel wesentlich langsamer sich zu vollziehen scheint als die der vaccinalen Papille. Diese Verzögerung kann darauf beruhen, daß bei der natürlichen variolösen Infektion die Zahl der infizierenden Keime geringer ist als bei der künstlichen variolösen (Inokulation) oder vaccinalen Infektion. Wir sehen nämlich auch die vaccinalen Erscheinungen bei geringer Menge des eingebrachten virulenten Materials sich verspätet entwickeln. Ebenso kann die Verschiedenheit des Infektionsmodus, der bei der künstlichen ein unmittelbarer, bei der natürlichen Infektion ein mittelbarer ist, als die Ursache der längeren Inkubationsdauer angesehen werden.

Auf jeden Fall müssen wir aus der Tatsache, daß vom Einbruch der Erreger in den arteriellen Kreislauf bis zum Auftreten der Pockenpusteln in den unteren Extremitäten 5 Tage vergehen, auf eine Mindestdauer der Inkubation bei der natürlichen variolösen Infektion von 5 Tagen schließen. Wie ist aber damit die um 2—3 Tage früher einsetzende Eruption der Pockenpusteln auf der Haut und Schleimhaut des Kopfes zu vereinigen? Unterschiede im Wesen des Virus und in der Art des Infektionsmodus sind nicht gegeben, es müssen also Unterschiede in der Beschaffenheit der einzelnen Teile des Körpers vorhanden sein. Eine Erklärung kann uns die schon bei der Betrachtung der vaccinalen Infektion gewonnene Annahme liefern, daß die hüllenlösenden Antikörper lokal-histogenen Ursprungs sind und daß die auf ihnen beruhende Zustandsveränderung des Gewebes sich nicht auf dem Wege der Blutbahn, sondern per contiguitatem über den Körper verbreitet. Die regionären Verschiedenheiten im zeitlichen Auftreten des variolösen Exanthems können als die Wirkung einer Sensibilisierung des Gewebes angesehen werden, die an der Schleimhautstelle, in welcher sich die Protopustel gebildet hat, beginnt, also in deren unmittelbarsten Umgebung am frühesten und an den vom Sitz der Protopustel entferntesten Stellen des Körpers am spätesten wirksam wird. Tatsächlich erscheinen die Pockenpusteln auf den einzelnen Stellen der Haut- und Schleimhautoberfläche des Körpers genau in der Reihenfolge, in der wir uns das Fortschreiten einer Sensibilisierung vorstellen müssen, die von einer lokal entstandenen und auf dem Wege des unmittelbaren Kontaktes sich über den Körper verbreitenden Umstimmung des Gewebes bedingt wird. Auch *Pirquet* hat zwischen der regionär verschiedenzeitigen Ausbreitung des Exanthems und der Verbreitung der Antikörper Zusammenhänge vermutet, ohne sich eine Deutung der Vorgänge machen zu können, weil er die lokale Bildung der hüllenlösenden Antikörper von der zentralen Entwicklung der viruliciden Substanzen nicht scharf genug trennte.

Die Annahme einer 5tägigen Inkubation bei der natürlichen variolösen Infektion erlaubt zugleich eine Festlegung der Zeitspanne, um



welche die Inkubation infolge der Sensibilisierung durch eine vorausgegangene Infektion im Maximum verkürzt wird. Die ersten Pockeneruptionen, nämlich die auf der Schleimhaut des Mundes und des Rachens, treten in der zweiten Hälfte des 3. Tages nach Beginn der Erkrankung auf, die Pusteln auf den unteren Extremitäten erst nach 5 Tagen. Wir haben also eine Verkürzung der Inkubation um annähernd $2^1/_2$ Tage. Bei der vaccinalen Erstinfektion sehen wir die ersten Zeichen der Entwicklung der Papille nach Ablauf von 3 Tagen, bei der ausgesprochenen Frühreaktion schon im Verlauf des ersten Tages, also auch hier eine Verkürzung der Inkubation um annähernd $2^1/_2$ Tage. Die Zeitspanne, um welche die hüllenlösende Fähigkeit des Gewebes infolge der Sensibilisierung durch eine vorausgegangene Infektion beschleunigt wird, ist demnach trotz der Verschiedenheit der Inkubation an sich bei Variola und Vaccine vollkommen gleich.

Am 8. Tage der Erkrankung beginnt nach einem fieberfreien Intervall von 2 Tagen die Vereiterung der Pusteln und die entzündliche Rötung und Schwellung der Haut um die Basis der Pocke. Bei dicht stehenden Pocken kommt es durch Konfluieren der einzelnen Höfe zu einem diffusen entzündlichen Ödem. Das entzündliche Ödem bei den Pocken ist als Analogon der vaccinalen Areola hervorgerufen durch die Einwirkung der viruliciden Antikörper auf die hüllengelösten, in die Umgebung der Pustel übertretenden lebenden Keime. Der variolöse Prozeß endigt mit der Abtötung des Virus durch viruliciđe Substanzen und der Abkapselung und Ausstoßung des Virus unter Beihilfe der Leukocyten.

Zwei Formen der Variola bedürfen noch kurz der Besprechung: Die Purpura variolosa, die schwerste aller Pockenformen, die gewöhnlich noch vor dem Auftreten des variolösen Exanthems im Initialstadium letal endet und die wenigstens in der Mehrzahl der Fälle zum Tode führende Variola pustulosa haemorrhagica, bei welcher die Blutungen am ausgebrochenen Pockenexanthem gewöhnlich erst im Verlaufe der Suppuration erscheinen.

Die Verkürzung der Inkubation bei der Purpura variolosa, die perakut mit schwersten lokalen und allgemeinen Störungen einsetzende Erkrankung, die vor dem Eruptionsstadium auftretenden, bis handtellergroßen hämorrhagischen Infiltrate der Haut und Blutungen aus den inneren Organen sprechen für eine durch die Schwere der Infektion, durch individuelle Disposition oder durch beides bedingte allzu rasch und intensiv einsetzende Wirkung der lytischen Körper.

Dagegen stimmt die Variola haemorrhagica pustulosa in Inkubation und Initialstadium, also in der Entwicklung der lytischen Antikörper mit der Variola vera vollkommen überein. Die zu Blutungen führende Schädigung der Gefäße zeigt sich erst im Stadium der Einwirkung





der viruliciden Antikörper auf den Erreger, ist also hier der Ausdruck einer in gleicher Weise wie bei der Purpura variolosa bedingten allzu intensiv einsetzenden, doch meist bald erlahmenden Wirkung nicht der lytischen, sondern der viruliciden Substanzen.

Die durch die Vaccination hervorgerufene Änderung der Reaktionsfähigkeit des Organismus, welche die wechselnden revaccinalen Bilder bedingt, führt auch der variolösen Infektion gegenüber zu einer größeren Mannigfaltigkeit der krankhaften Erscheinungen, deren einzelne Formen mit denen der Revaccine in weitgehender Übereinstimmung stehen.

Einen der revaccinalen Frühreaktion entsprechenden Vorgang müssen wir annehmen, wenn die Infektion mit Variola einen infolge der Vaccination völlig refraktären Organismus trifft. Da die hüllenlösende Fähigkeit des Gewebes noch ungeschmälert vorhanden ist und die viruliciden Substanzen ebenfalls in ausreichendem Maße rasch zur Verfügung gestellt werden können, so kommt es am Sitze der Protopustel zur Frühreaktion, die der unmittelbaren Wahrnehmung entzogen ohne Symptome verläuft.

Innerhalb des Rahmens der erworbenen anscheinend völligen Immunität gegen Variola bewegen sich sicherlich noch Vorgänge im Organismus, die wegen der Geringfügigkeit der Erscheinungen zu keinen subjektiv fühlbaren Störungen führen, unserer Beobachtung demnach entzogen bleiben, aber noch den ersten Stufen der beschleunigten vaccinalen Reaktion entsprechen. Zur Variolois, auch in ihren leichtesten Formen, führt die variolöse Infektion erst dann, wenn die hüllenlösende Fähigkeit des Gewebes verschwunden und auch eine erhöhte Bereitschaft zu ihrer Wiedergewinnung an sich nicht gegeben ist, während die Bereitschaft zur beschleunigten Neubildung der viruliciden Antikörper in höherem oder geringeren Maße im Organismus noch besteht, die Neubildung jedoch nicht mehr rechtzeitig oder nicht in genügendem Maße erfolgt, um in der Protopustel die sofortige völlige Abtötung der Erreger nach Lösung ihrer Hüllen zu ermöglichen. Wir sehen demnach bei der Variolois die gleiche Inkubation, die gleiche Länge und häufig auch die gleiche Heftigkeit der initialen Erscheinungen wie bei der Variola. Erst mit dem Eruptionsstadium tritt der allergische Charakter der Erkrankung deutlich zu Tage. Der beschleunigten Reaktion bei der Revaccination entspricht die Variolois demnach nur hinsichtlich des eigentlichen varioloiden Exanthems.

Die Bereitschaft zur beschleunigten Neubildung der viruliciden Antikörper geht schon daraus hervor, daß die initialen Exantheme bei der Variolois häufiger beobachtet werden als bei der Variola vera. Ihr Auftreten gilt daher auch als ein prognostisch günstiges Symptom.

Wie die Häufigkeit der initialen Exantheme, so hängt auch die Art und Schwere der initialen Krankheitserscheinungen in erster Linie



davon ab, wie rasch und in welchem Umfang die Neubildung der viruliciden Antikörper erfolgt. Während bei der Variola vera mit großer Regelmäßigkeit schwere Allgemeinerscheinungen vorhanden sind, verläuft das Initialstadium der Variolois bald mit nur mäßigen, bald mit ebenso intensiven Störungen des Allgemeinbefindens wie bei Variola vera. Wenn nämlich infolge frühzeitiger Neubildung und Einwirkung der viruliciden Substanzen schon in der Protopustel die Vermehrung der Erreger eingeschränkt ist, werden die durch ihren Einbruch in den arteriellen Kreislauf hervorgerufenen Erscheinungen geringer sein als dann, wenn die viruliciden Antikörper erst später in ausreichende Wirksamkeit treten.

Die Entwicklung des varioloiden Exanthems ist ebenfalls unter dem Einfluß der viruliciden Antikörper häufig überstürzt, unvollkommen, atypisch. Das entzündliche Ödem der Haut hält sich in engen Grenzen, die Zahl der auf der Haut und den Schleimhäuten gebildeten Efflorescenzen schwankt beträchtlich. Sie hängt ab einmal von der Menge der in der Protopustel gebildeten Keime, deren Vermehrung schon dort durch viruli̇cide Antikörper gehemmt sein kann und dann von der Menge der viruliciden Antikörper selbst, denen das Virus nach seinem Einbruch in den arteriellen Kreislauf innerhalb der Blutflüssigkeit selbst und vor allem bei seiner Ablagerung im Gewebe begegnet.

So kommt es einerseits zum völligen Ausbleiben des Exanthems bei der Variola sine exanthemate oder zur Ausbildung nur vereinzelter, rasch verkümmernder Papeln, andererseits zu Exanthemen, die auch hinter schweren Fällen von Variola vera nach Ausdehnung und Verlauf kaum zurückbleiben. In der Mannigfaltigkeit der Bilder bei Variolois spiegelt sich wie bei der beschleunigten vaccinalen Reaktion die wechselnde größere oder geringere Bereitschaft des Organismus zur Neubildung virulicider Körper.

Eine besondere Form der Variolois, welche der Revaccine petechialis entspricht, bildet die Variolois petechialis. Ihre grundsätzliche Verschiedenheit von den hämorrhagischen Formen der Variola ist bisher nicht in genügendem Maße bekannt und daher ihre Abgrenzung von dieser nicht streng durchgeführt worden. Sie wird vorwiegend bei älteren Leuten, die vor längerer Zeit revacciniert wurden, beobachtet und ihre Prognose ist günstig. Die Efflorescenzen tragen wie bei der gewöhnlichen Form der Variolois überstürzten, atypischen Charakter, sind jedoch deutlich graurötlich verfärbt und wie bei der Revaccine petechialis von meist kleinen, doch deutlich als solche erkennbaren Petechien umgeben. Nicht selten tritt namentlich an den unteren Extremitäten an die Stelle der Pocken unmittelbar die petechiale Veränderung des Gewebes. Diese hyperergische varioloide Form ist die Wirkung sehr intensiv einsetzender, doch nicht wie bei der Variola





pustulosa haemorrhagica bald erlahmender, sondern anhaltender und darum zur Abheilung der Infektion führender Wirkung der viruliciden Substanzen.

Bei älteren Leuten, deren Erst- bzw. Revaccination Jahrzehnte zurückliegt, läßt die Variolois zuweilen entsprechend der Revaccine mit erstvaccinalem Typus auch in der Entwicklung des Exanthems den allergischen Charakter nur mehr andeutungsweise oder gar nicht erkennen. Die Fähigkeit zur beschleunigten Neubildung virulicider Substanzen ist ebenso wie die erhöhte Bereitschaft des Gewebes zur Lösung der Hüllen völlig oder fast völlig verschwunden.

Ein Verhalten des varioloiden Exanthems bedarf noch der Erklärung. Wir sehen nämlich bei einer Reihe von meist leichteren Fällen das Exanthem nicht in der Reihenfolge wie bei der Variola vera, also nicht zuerst im Gesicht, sondern an anderen oder gleichzeitig an verschiedenen Körperstellen, mitunter auch schubweise erscheinen, so daß neben ausgebildeten Pusteln Stippchen, Papeln und Bläschen zu finden sind. Diese Unregelmäßigkeit im Auftreten des Exanthems läßt sich nur mit Verschiedenheiten der Reaktionsfähigkeit der einzelnen Körperstellen erklären und weist darauf hin, daß nicht nur die hüllenlösende Fähigkeit des Organismus an das Körpergewebe gebunden ist, sondern daß auch die viruliciden Antikörper nur im Zusammenhang mit den Gewebselementen zur Wirkung gelangen. Die Auffassung der Immunität bei Variola und Vaccine als einer an das Gewebe gebundenen Veränderung der Reaktionsfähigkeit des Organismus ist demnach mit den hier entwickelten, gegenüber den ursprünglichen Theorien *Pirquets* modifizierten Vorstellungen durchaus zu vereinen.

---





(Aus dem Hygienischen Institut der königl. ungar. Universität in Budapest [Direktor: Prof. *L. v. Liebermann*].)

# Wirkung der Milchsäure bei experimentellen Infektionen.

Von
Dr. **Julius Freund.**

Da die Virulenzsteigerung der Bakterien bisher nur auf biologischem Wege gelang [Tierpassage, Züchtung auf Nährböden, die Stoffe tierischer Provenienz enthalten, oder in vitro auf Gewebskulturen[1])], überrascht *H. Muchs*[2]) Mitteilung, daß es ihm gelungen ist, apathogene Bakterien in pathogene umzuwandeln dadurch, daß diese auf Milchsäure, bzw. Ameisensäure enthaltenden Nährböden gezüchtet wurden. *Muchs* Mitteilung ist nicht nur darum überraschend, daß gemäß seinen Versuchen die Virulenz auch auf chemischem Wege gesteigert werden kann, sondern auch darum, weil wir wegen der antiseptischen Wirkung der Milchsäure eher eine Verminderung als Steigerung der Virulenz erwarten möchten. In *Muchs* Versuchen spielt der Bac. subtilis, Proteus, $X_{19}$, Bac. mycoides und die aus der Luft gezüchtete Sarcine eine Rolle. Unter seinen Feststellungen scheint folgende die wichtigste zu sein: „Zusatz von Milchsäure zu Bouillon, macht darin gezüchtete Heubacillen mäusevirulent. Das ist um so wichtiger, als Heubacillen durch gleichzeitige Milchsäuregabe nicht mäusevirulent werden."

Da bei Infektionen mit Milchsäure enthaltender Bouillonkultur es nicht ausgeschlossen ist, daß die mit der Bouillon eingeführte Milchsäure auf das infizierte Tier selbst wirkt, wäre in Betracht zu ziehen, daß hier vielleicht doch nicht von Virulenzsteigerung, sondern eher von schädlicher Beeinflussung des Organismus und Verringerung seiner Abwehrfähigkeit die Rede sein kann. So zeigten *Vaillard* und *Vincent*[3]), daß, wenn wir mit in ihrer Virulenz geschwächten Tetanusbakterien Versuchstiere infizieren und dann auch noch Milchsäure injizieren, der Verlauf der Infektion ein solcher ist, als ob die Infektion mit vollvirulenten Bakterien erfolgt wäre. Auch bei Oedema malignum hat man die infektionsfördernde Wirkung der Milchsäureinjektion festgestellt. Interessant

[1]) *Bächer,* Wien. klin. Wochenschr. 1915, Nr. 43.
[2]) *H. Much,* Dtsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 22.
[3]) Zitiert nach *Kitt,* Bakterienkunde 1893, S. 325.

sind die Versuche von *Himmel*[1]), welcher mit *Ducrey*bacillen nur dann bei Meerschweinchen Sepsis hervorrufen konnte, wenn er eine halbe Stunde vor der Injektion der Bakterien in das Peritoneum, Milchsäure in die Bauchhöhle injizierte. *Himmel* erklärt diese Beobachtung mit der bekannten negativ chemotaktischen Wirkung der Milchsäure.

*Muchs* Beobachtung, bzw. die Frage der Virulenzsteigerung auf chemischem Wege ist von großer theoretischer und praktischer Bedeutung, und darum schien es lohnend, sich mit dieser Frage eingehender zu beschäftigen.

Den bei diesen Versuchen verwendeten Subtilisstamm züchtete ich aus Heuabguß. Zu den Versuchen benützte ich 18—22 g schwere weiße Mäuße. Die Milchsäure — welche ich auf ihre Reinheit kontrollierte — war ein *Merck*sches Präparat. Ehe ich mit den Versuchen — wie die Subtilisinfektion durch die Milchsäure beeinflußt wird — begann, wollte ich Klarheit darüber haben, wie das Tier gesondert Infektion und Milchsäureinjektion verträgt.

*Tabelle I.*
*Infektion ohne Milchsäure.*

| | | | |
|---|---|---|---|
| Nr. 4. | 0,5 ccm | Bouillonkultur | verendet nach 1 Tage. |
| Nr. 5. | 0,5 „ | „ | lebt in der 11. Woche. |
| Nr. 7. | 0,5 „ | „ | „ „ „ 11. „ |
| Nr. 15. | 0,5 „ | „ | „ „ „ 10. „ |
| Nr. 66. | 0,5 „ | „ | „ „ „ 5. „ |
| Nr. 67. | 0,5 „ | „ | „ „ „ 5. „ |
| Nr. 22. | 3tägige Bouillonkultur 0,5 ccm, getötet am 22. Tage. | | |
| Nr. 23. | 3tägige Bouillonkultur, 0,5 ccm, lebt in der 6. Woche. | | |

Diese Tafel zeigt, daß nach subcutaner Injektion einer 24stündigen Subtilisbouillonkultur unter 8 Mäusen nur eine verendete, die anderen 7 die Infektion gut vertrugen.

*Tabelle II.*

Nr. 3. 0,5 ccm 1% Milchsäure enthaltende phys. NaCl-Lösung subcutan: lebt in der 10. Woche.

Nr. 30. 0,5 ccm 5% Milchsäure enthaltende phys. NaCl-Lösung subcutan: lebt in der 9. Woche.

Nr. 86. 0,5 ccm 5% Milchsäure enthaltende phys. NaCl-Lösung subcutan: lebt in der 5. Woche.

Nr. 88. 0,5 ccm 7,5% Milchsäure enthaltende phys. NaCl-Lösung subcutan: lebt in der 5. Woche.

Nr. 89. 0,5 ccm 8% Milchsäure enthaltende phys. NaCl.-Lösung subcutan: lebt in der 5. Woche.

Nr. 31. 0,5 ccm 10% Milchsäure enthaltende phys. NaCl-Lösung subcutan: verendet am 8. Tage.

Nr. 42. 0,5 ccm 2% Milchsäure enthaltende phys. NaCl-Lösung intraperitoneal, lebt in der 8. Woche.

[1]) *Himmel*, Annal. de l'inst. Pasteur 1901, S. 930.

Nr. 43. 0,5 ccm 2% Milchsäure enthaltende phys. NaCl-Lösung intraperitoneal, lebt in der 8. Woche.
Nr. 92. 0,5 ccm 2% Milchsäure enthaltende phys. NaCl-Lösung intraperitoneal, lebt in der 5. Woche.
Nr. 90. 0,5 ccm 3% Milchsäure enthaltende phys. NaCl-Lösung intraperitoneal, lebt in der 5. Woche.
Nr. 91. 0,5 ccm 3% Milchsäure enthaltende phys. NaCl-Lösung intraperitoneal, lebt in der 5. Woche.
Nr. 87. 0,5 ccm 5% Milchsäure enthaltende phys. NaCl-Lösung intraperitoneal, verendet nach 5 Stunden.
Nr. 89. 0,5 ccm 7,5% Milchsäure enthaltende phys. NaCl-Lösung intraperitoneal, verendet nach 3 Stunden.

Aus der zweiten Tabelle tritt hervor, daß $^1/_2$ ccm einer 10 proz. Milchsäurelösung, subcutan gegeben, das Tier tötet, wogegen eine 8 proz. Verdünnung in derselben Menge vom Tiere anscheinend noch gut vertragen wird. Bei intraperitonealer Injektion verträgt die weiße Maus $^1/_2$ ccm einer 3 proz. Milchsäureverdünnung; die 5 proz. Verdünnung in derselben Menge — ebenso gegeben — wirkt tödlich.

*Tabelle III.*

*Infektionen mit Milchsäure enthaltender Bouillonkultur.*

Nr. 1. 0,5 ccm einer 1% Milchsäure enthaltender Bouillonkultur, subcutan: verendet am 3. Tage.
Nr. 2. 0,5 ccm einer 1% Milchsäure enthaltender Bouillonkultur, subcutan: verendet am 2. Tage.
Nr. 26. 0,5 ccm einer 1% Milchsäure enthaltender Bouillonkultur, subcutan: verendet am 3. Tage.
Nr. 27. 1,0 ccm einer 1% Milchsäure enthaltender Bouillonkultur, subcutan: verendet am 2. Tage.
Nr. 57. 0,25 ccm einer 1% Milchsäure enthaltender Bouillonkultur, subcutan: verendet am 8. Tage.
Nr. 58. 0,25 ccm einer 1% Milchsäure enthaltender Bouillonkultur, subcutan: verendet am 3. Tage.
Nr. 61. 0,5 ccm einer 1% Milchsäure enthaltender Bouillonkultur, subcutan: verendet am 19. Tage (ständig matt).
Nr. 62. 0,5 ccm einer 1% Milchsäure enthaltender Bouillonkultur, subcutan: verendet am 21. Tage (ständig matt).
Nr. 84. 0,5 ccm einer 2% Milchsäure enthaltender Bouillonkultur, subcutan: verendet am 4. Tage (Geschwür).
Nr. 85. 0,5 ccm einer 2% Milchsäure enthaltender Bouillonkultur, subcutan: lebt in der 7. Woche, verlor 7 g an Gewicht.
Nr. 9. 0,5 ccm einer 0,1% Milchsäure enthaltender Bouillonkultur, subcutan: lebte in der 7. Woche.
Nr. 10. 0,5 ccm einer 0,1% Milchsäure enthaltender Bouillonkultur, subcutan: lebt in der 7. Woche.
Nr. 11. Die bei Nr. 9 verwendete Kultur mit 1 proz. Milchsäure 5fach verdünnt: verendet am 2. Tage.
Nr. 12. Die bei Nr. 11 verwendete Kultur mit 1 proz. Milchsäure 5fach verdünnt: lebt in der 7. Woche.



Diese Tafel zeigt, daß, wenn wir Subtilisbacillen in 1% Milchsäure enthaltender Bouillon züchten, 0,5 ccm dieser Bouillonkultur subcutan gegeben, die weiße Maus tötet. Aus der Milz und Leber der verendeten Tiere konnte man in jedem Falle den Heubacillus züchten. Schon hier muß hervorgehoben werden, daß in 1 proz. Milchsäure enthaltender Bouillonkultur die Zahl der Bakterien ungefähr 4 mal geringer ist als in gewöhnlicher Bouillonkultur, infolge der bekannten, die Entwicklung verhindernden Wirkung der Milchsäure. Die Versuche 9—12 zeigen, daß die Milchsäure in der Verdünnung von 0,1% nicht genügt, um die obige Wirkung zu erzielen, trotzdem daß die 0,1 proz. Milchsäuremenge das Wachstum der Subtilisbacillen nicht hindert.

Die auf Tab. I, II, III beschriebenen Versuchsergebnisse zusammenfassend, kann festgestellt werden, daß in der 1% Milchsäure enthaltender Bouillon gewachsene Subtilisbacillen mit der Nährflüssigkeit zusammen injiziert, die weiße Maus töten, obzwar die in den Versuchen auf Tab. III vorkommenden Bacillen- bzw. Milchsäuremengen von der tödlichen Dosis ziemlich weit entfernt sind.

Nun untersuchte ich, wie sich die Infektion in dem Falle gestaltet, wenn der 24stündigen Bouillonkultur unmittelbar vor der Injektion Milchsäure zugesetzt wird.

*Tabelle IV.*

*Infektionen mit Bouillonkultur, welcher erst unmittelbar vor der Injektion Milchsäure zugesetzt wurde.*

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr. 24. | 0,5 ccm | 3tägige | Kultur | 1,5% | Milchsäuregehalt | verendet am 7. Tage. |
| Nr. 25. | 0,1 „ | „ | „ | 1,5% | „ | lebt in der 10. Woche. |
| Nr. 28. | 0,25 „ | 1 tägige | „ | 5% | „ | verendet am 5. Tage. |
| Nr. 29. | 0,5 „ | „ | „ | 5% | „ | „ „ 3. „ |
| Nr. 32. | 0,5 „ | „ | „ | 1% | „ | „ „ 2. „ |
| Nr. 33. | 0,5 „ | „ | „ | 1% | „ | „ „ 5. „ |

Gemäß dieser Tabelle ist zur — die Subtilisinfektion befördernden — Wirkung der Milchsäure nicht nötig, daß die Bakterien auf Milchsäure enthaltendem Nährboden gezüchtet werden, sondern es genügt, wenn wir die Milchsäure unmittelbar vor der Injektion zur Kultur zusetzen. *Diese Versuchsreihe macht es wahrscheinlich, daß die Milchsäure ihre, die Infektion befördernde, Wirkung nicht als nährbodenverbessernder Stoff ausübt, wie dies Much behauptet, sondern durch die Beeinflussung des infizierten Tieres.*

Die Klärung dieser Frage bezwecken die Versuche, zu welchen in gewöhnlicher Bouillon gezüchtete Bakterien und Milchsäure gesondert in das Tier injiziert wurden. Die Kultur wurde bei jedem Versuch subcutan, die Milchsäure teils subcutan, teils intraperitoneal injiziert. Die Milchsäure wurde mit 0,9 proz. Kochsalzlösung verdünnt.



*Tabelle V.*

*Milchsäure und Subtiliskultur auf verschiedene Stellen injiziert.*

**Nr. 13.** 0,5 ccm einer 1% Milchsäure enthaltender Bouillon subcutan, 0,5 ccm Bouillonkultur subcutan: verendet am 7. Tage.
**Nr. 14.** 0,5 ccm einer 1% Milchsäure enthaltender Bouillon subcutan, 0,5 ccm Bouillonkultur subcutan: verendet am 2. Tage.
**Nr. 34.** 0,5 ccm einer 2% Milchsäure enthaltender Bouillon subcutan, 0,5 ccm Bouillonkultur subcutan: verendet am 2. Tag.
**Nr. 35.** 0,5 ccm einer 2% Milchsäure enthaltender Bouillon subcutan, 0,5 ccm Bouillonkultur subcutan: verendet am 3. Tage.
**Nr. 84.** 0,5 ccm einer 2% Milchsäure enthaltender Bouillon subcutan, 0,5 ccm Bouillonkultur subcutan: verendet am 5. Tage.
**Nr. 85.** 0,5 ccm einer 2% Milchsäure enthaltender Bouillon subcutan, 0,5 ccm Bouillonkultur subcutan: in 23 Tagen Gewicht von 29 g auf 19 gefallen.
**Nr. 44.** 0,5 ccm einer 1% Milchsäure enthaltender Bouillon intraperitoneal, 0,5 ccm Bouillonkultur subcutan verendet am 2. Tage.
**Nr. 45.** 0,5 ccm einer 1% Milchsäure enthaltender Bouillon intraperitoneal, 0,5 ccm Bouillonkultur subcutan: verendet am 2. Tage.
**Nr. 46.** 0,5 ccm einer 1% Milchsäure enthaltender Bouillon intraperitoneal, 0,5 ccm Bouillonkultur subcutan: 1 Tag krank, lebt in der 7. Woche.
**Nr. 47.** 0,5 ccm einer 1% Milchsäure enthaltender Bouillon intraperitoneal, 0,5 ccm Bouillonkultur subcutan: verendet am 4. Tage.
**Nr. 63.** Behandlung wie bei Nr. 44—47: 4 Tage matt, lebt in der 6. Woche.
**Nr. 64.** Behandlung wie bei Nr. 44—47: verendet am 11. Tage.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß die Milchsäure die Subtilisinfektion befördernde Wirkung auch dann ausübt, wenn sie nicht mit der Kultur injiziert wird. Diese durch Versuche festgestellte Tatsache nimmt der Annahme die Berechtigung, daß die die Infektion fördernde Wirkung der Milchsäure auf Steigerung der Bakterienvirulenz oder auf anderer, unmittelbar die Bakterien beeinflussender Wirkung beruht. Die in Frage stehende Wirkung der Milchsäure ist nur so zu deuten, daß die Milchsäure die Widerstandsfähigkeit des infizierten Tieres verringert.

Alle diese Versuche werden durch zwei Versuchsreihen vervollständigt, in welcher *erstens*: in *gewöhnlicher Bouillon gezüchtete Bakterien* nach scharfem Abzentrifugieren in Milchsäure enthaltender Bouillon aufgeschwemmt in die Versuchstiere injiziert wurden; *zweitens*: in *Milchsäure enthaltender Bouillon* gezüchtete Bakterien nach scharfem Abzentrifugieren in gewöhnlicher Bouillon aufgeschwemmt zu den Injektionen verwendet wurden.

*Tabelle VI.*

*In gewöhnlicher Bouillon gezüchtete Bakterien mit Milchsäure enthaltender Bouillon emulgiert.*

Nr. 19. 1 Tag matt, lebt in der 10. Woche.
Nr. 20. 1 Tag matt, lebt in der 10. Woche.
Nr. 40. Wochenlang matt, lebt in der 8. Woche.
Nr. 41. Wochenlang matt, verendet am 12. Tage.
Nr. 52. Wochenlang matt, verendet am 35. Tage.
Nr. 53. Wochenlang matt, lebt in der 6. Woche.



*Tabelle VII.*
*In Milchsäure enthaltender Bouillon gewachsene Bakterien in gewöhnlicher Bouillon emulgiert.*

Nr. 16. Keine Wirkung, lebt in der 10. Woche.
Nr. 17. Keine Wirkung, lebt in der 10. Woche.
Nr. 18. Keine Wirkung, lebt in der 10. Woche.
Nr. 36. Keine Wirkung, lebt in der 8. Woche.
Nr. 37. 0,7 ccm, keine Wirkung, lebt in der 8. Woche.
Nr. 54. 0,7 ccm, keine Wirkung, lebt in der 7. Woche.
Nr. 55. 0,7 ccm, keine Wirkung, lebt in der 7. Woche.

Tabelle VII zeigt, daß zur Subtilisinfektion nicht genügt, die Bakterien in einer 1% Milchsäure enthaltenden Bouillon wachsen zu lassen, da wenn wir sie von ihrem Originalnährboden absondern und mit gewöhnlicher Bouillon emulgiert injizieren, die Versuchstiere am Leben bleiben. Hingegen folgt aus Tab. VI, daß in gewöhnlicher Bouillon gezüchtete Heubacillen, von ihrem Originalnährboden abgesondert und in 1% Milchsäure enthaltender Bouillon aufgeschwemmt subcutan gegeben, einen Teil der Versuchstiere töten, die anderen schädlich beeinflussen. An der auf Tab. VI zusammengefaßten Versuchsreihe fällt auf, daß die Zahl der tödlichen Infektionen verhältnismäßig geringer ist, als in jener Versuchsreihe, in welcher Bouillonkultur und Milchsäure zusammen verwendet wurden (Tab. IV). Hier muß vielleicht daran gedacht werden, daß in den auf Tab. IV und III, sowie V zusammengefaßten Versuchen die gemeinsame Wirkung dreier Faktoren auftritt: 1. Bakterien, 2. Milchsäure, 3. die — in 24stündiger Bouillonkultur enthaltenen, gelösten —, während des Wachstums entstandenen Stoffe (künstliche Aggressine?). In den Versuchen auf Tab. VI war die Infektion vielleicht deshalb in verhältnismäßig wenigen Fällen tödlich, weil der dritte Faktor fehlt.

Nachdem die, die Subtilisinfektion fördernde Wirkung der Milchsäure aus oben beschriebenen Versuchsanordnungen unzweifelhaft schien, wünschte ich zu untersuchen, auf welchen Bestandteil der Milchsäure — ob auf die Hydrogenione oder auf die Lactatione — diese zurückzuführen sei.

Um diese Frage zu untersuchen, injizierte ich weißen Mäusen *in Natriumlactatbouillon gezüchtete Subtiliskulturen*. Die verwendete Bouillon enthielt 1,3% Natriumlactat, welche Menge mit 1 proz. Milchsäure äquimolekular ist. Die Ergebnisse dieser Versuche sind auf Tab. VIII ersichtlich.

*Tabelle VIII.*
*Infektion mit 1,3% Natriumlactat enthaltender Bouillonkultur.*

Nr. 48 lebt in der 7. Woche.
Nr. 49 lebt in der 7. Woche.
Nr. 50 lebt in der 7. Woche.
Nr. 51 verendet am 5. Tage.
Nr. 55a lebt in der 6. Woche.
Nr. 56 lebt in der 6. Woche.





Aus Tab. VIII tritt das hervor, daß die subcutane Injektion der Natriumlactat enthaltenden Bouillonkultur von 6 Versuchstieren nur bei einem tödliche Sepsis verursachte. Diese Feststellung, verglichen mit dem auf Tab. III verzeichnetem Ergebnis, berechtigt zu dem Schluß, daß die beschriebene Milchsäurewirkung nicht dem Lactat, sondern dem Wasserstoffion zuzuschreiben ist.

*Zusammenfassung.*

Wenn man Mäuse mit Milchsäure enthaltender Subtiliskultur infiziert, verenden die Mäuse infolge Subtilissepsis. Dasselbe tritt auch dann ein, wenn wir in die Mäuse Subtiliskultur und Milchsäure gesondert, jedoch gleichzeitig injizieren. Die die Infektion fördernde Wirkung der Milchsäure beruht nicht auf der Steigerung der Bakterienvirulenz, sondern auf der Verminderung der Widerstandsfähigkeit des Organismus.

Diese Wirkung der Milchsäure tritt nur bei Anwendung der freien Säure ein.

Diese Versuche zeigen auch, daß chemische Stoffe, welche in vitro bactericide Wirkung ausüben, in das infizierte Tier gebracht, die Infektion des Tieres fördern können.

Die vorstehenden Ergebnisse bestätigen im wesentlichen die uns leider verspätet bekanntgewordene Arbeit von *B. Lange* und *M. Yoshioka*[1]); mit dem Unterschiede, daß es uns ebenso wie *Much* gelungen ist, bei Verwendung von Milchsäure eine Sepsis mit Subtiliskulturen herbeizuführen, aber ohne uns der Deutung, wie sie *Much* gibt, anschließen zu können. *Lange* und *Yoshioka* machen auch noch die wichtige Mitteilung, daß auch *abgetötete* Proteuskulturen bei Verwendung von Milchsäure im Sinne *Muchs* wirken, was natürlich entschieden gegen *Muchs* Auffassung spricht, die auch wir ablehnen.

---

[1]) Dtsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 44.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität in Budapest [Direktor: Prof. *L. v. Liebermann*].)

# Über das Verhalten einer Modifikation des sog. künstlichen Komplements bei der Wassermann-Reaktion.

Von
Dr. **Julius Freund.**

In seiner zweiten Form besteht das *Liebermann*sche sogenannte künstliche Komplement aus folgenden Substanzen: 0,1 proz. methylalkoholische Natriumoleinatlösung, 0,1 proz. methylalkoholische Calciumchloridlösung, inaktiviertes und mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntes Kaninchenserum.

Im Gemische vertritt die Seife den blutkörperchenlösenden, die beiden anderen die lösende Wirkung abstumpfende Substanz.

Der Begriff des künstlichen Komplementes an und für sich macht es wünschenswert, das inaktivierte Tierserum durch eine einfachere und vom natürlichen Komplemente ferner stehende Substanz zu ersetzen. Da die seifenabstumpfende Wirkung des inaktivierten Tierserums wahrscheinlich vom Eiweißbestandteil des Serums abhängt, versuchte ich das Ersetzen des Serums mit Globulinlösungen.

Die Zusammensetzung des künstlichen Komplementes, das ich bei einem Teil meiner Versuche verwendete, unterschied sich von ursprünglichem auch noch in einer anderen Beziehung. Ich verwendete nämlich als Lösungsmittel der Seife destilliertes Wasser, und schaltete das Calciumchlorid aus. Die erste Form des künstlichen Komplementes schreibt 0,9% Kochsalzlösung als Lösungsmittel der Seife vor. Da aber beim Vermischen der Natriumoleinat- und $CaCl_2$-Lösungen das entstehende Calciumoleinat in Kochsalzlösung gefällt wird, hat *Liebermann* später Methylalkohol als Lösungsmittel der beiden Substanzen verwendet, in welchem auch das Calciumoleinat sich löst (s. die vorstehende Mitteilung von *Scheff-Dabis*).

Die von mir versuchte Ausschaltung des Methylalkohols als Lösungsmittel hatte zwei Ursachen: erstens ruft es in den Globulinlösungen störende Fällungen hervor, zweitens hatten wir in jener Zeit, wo ich meine Versuche vornahm, mit dem Methylalkohol große Schwierigkeiten. Wir haben uns mehrfach überzeugen können, daß der Ablauf der Versuche größtenteils von der Reinheit des Methylalkohols abhängt, schon



deswegen, weil ein Teil der im Handel erhältlichen Methylalkoholpräparate schon in recht geringen Dosen die Hammelblutkörperchen lösten. Die im Handel erhältlichen Methylalkoholpräparate sind größtenteils nicht chemisch rein; ihre Reinigung ist sehr umständlich und teuer. Als Ersatz des Methylalkohols habe ich statt der in der Originalvorschrift angegebenen Kochsalzlösung deshalb destilliertes Wasser verwendet, denn eine wässerige Natriumoleinatlösung ist beständiger, als jene, die Kochsalz enthält. Zwecks Herstellung der Globulinlösung habe ich Rinderserum mit destilliertem Wasser auf das zehnfache verdünnt und fügte solange verdünnte Essigsäure hinzu, bis der neuerlich zugegebene Essigsäuretropfen keine Vermehrung der Fällung hervorrief. Nachdem sich die entstandene Fällung absetzte, dekantierte ich die Flüssigkeit, habe mit ein wenig Essigsäure enthaltendem destilliertem Wasser die Fällung dreimal durch Zentrifugieren ausgewaschen und das zurückgebliebene Sediment in 0,9 proz. Kochsalzlösung aufgelöst. In 25 ccm Kochsalzlösung wurde die von 100 ccm Rinderserum gewonnene Fällung aufgelöst; zur Kochsalzlösung habe ich hie und da noch einige Tropfen doppeltnormal Natronlauge gegeben, um die Lösung vollkommen zu machen. Zu dieser Globulinlösung wurde von einer 5 proz. Carbollösung soviel hinzugesetzt, daß deren Phenolgehalt $^1/_2$% betrug. Die Globulinlösung wurde zu den hämolytischen Versuchen in einer Verdünnung von 1: 5 verwendet. Die Seifenhämolyse abstumpfende Wirkung der Globulinlösung beleuchtet folgender Versuch mit einer 0,1 proz. Lösung von Natriumoleinat, von welcher 0,1 ccm ohne Zusatz von Globulin *schon nach 2 Minuten* komplette Hämolyse bewirkte.

In der Tabelle bedeutet: H. Hämolyse; K.H. keine Hämolyse; B.H. beginnende Hämolyse.

| 0.1% Natriumoleinatlösung (dest. Wasser) ccm | Globulinlösung (1 : 5) ccm | Hämolysin (1 : 200) ccm | Blutemulsion (5%) ccm | $^1/_2$ Std. | 1 Std. | $1^1/_2$ Std. | 2 Std. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,1 | 0,1 | 0,5 | 0,5 | H. | — | — | — |
| 0,1 | 0,2 | 0,5 | 0,5 | K.H. | B.H. | H. | H. |
| 0,1 | 0,3 | 0,5 | 0,5 | K.H. | K.H. | K.H. | H. |
| 0,1 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | K.H. | K.H. | K.H. | H. |
| 0,1 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | K.H. | K.H. | K.H. | H. |
| 0,1 | 0,6 | 0,5 | 0,5 | K.H. | K.H. | K.H. | H. |
| 0,1 | 0,7 | 0,5 | 0,5 | K.H. | K.H. | K.H. | H. |
| 0,0 | — | 0,5 | 0,5 | K.H. | K.H. | K.H. | K.H. |

Der Titer des Hämolysins war 1: 4000. Den Ablauf der Hämolyse beobachteten wir nicht im Wasserbad, sondern im Thermostat bei 37°. Aus obigem Versuch geht klar hervor, daß die verwendete Globulinlösung eine bedeutende seifenabstumpfende Wirkung besitzt, denn 0,1 ccm von einer 0,1 proz. Natriumoleinatlösung löst binnen 2 Minuten die sensibilisierten roten Blutkörperchen, dagegen hemmen die lösende



Kraft derselben Seifenmenge 0,2 ccm der Globulinlösung eine $^1/_2$ Stunde, 0,3 ccm $1^1/_2$ Stunden und 0,7 ccm 2 Stunden lang.

Wenn wir diese Versuche mit jenen vergleichen, in welchen zur Seifenabstumpfung inaktiviertes Tierserum benützt wird, fällt es auf, daß die abstumpfende Wirkung der Globulinlösung fast der des Tierserums entspricht, obzwar der Eiweißgehalt der Globulinlösung bedeutend kleiner ist als der des Serums. Der Eiweißgehalt der Globulinlösung, die wie oben geschildert, gewonnen wurde, belief sich auf etwa 0,5%. (Von drei Präparaten enthielt a) 0,5%, b) 0,6%, c) 0,45%.) Dagegen beträgt der Eiweißgehalt des Rinder- bzw. des Kaninchenserums rund 7%. Die seifenabstumpfende Wirkung der Globulinlösung würde 15 mal größer sein, als wir auf Grund der Eiweißbestimmung erwarten können. Mit der Erklärung dieser auffallenden Erscheinung möchte ich mich bei dieser Gelegenheit nicht beschäftigen; es ist wahrscheinlich, daß die Erklärung dieser Inkongruenz in dem verschiedenen Dispersitätsgrad des im Blutserum bzw. in der Globulinlösung enthaltenen Eiweißes zu suchen wäre. Man muß schon deshalb an obige Erklärung denken, da der neben Globulin im Blutserum vorhandene Eiweißkörper: das Albumin eine geringere Hämolyse hemmende Wirkung hat als das Globulin.

Wenn wir das mit Globulinlösung bereitete künstliche Komplement zu Bindungsversuchen verwenden wollen, müssen wir vor dem eigentlichen Bindungsversuch durch Vorversuche das entsprechende Verhältnis der Bestandteile ermitteln. Zuerst muß man jene kleinste Globulinmenge bestimmen, die imstande ist, die lösende Wirkung von 0,1 ccm Seifenlösung 2 Stunden hindurch bestimmt zu hemmen; dann muß jene Menge des in diesem Verhältnis bereiteten Seifenglobulingemisches bestimmt werden, die in einer halben Stunde lösend wirkt. Diese Menge verwenden wir als Komplementdosis in dem Hauptversuch. Die Festsetzung dieser Komplementdosis geschieht immer in Anwesenheit des Wassermannantigens. Das Ermitteln der Komplementdosis, die Titrierung des Komplementes wird durch folgenden Versuch demonstriert. Ich bestimmte vorher, daß 0,13 ccm die kleinste hemmende Globulindosis ist. Dann mischte ich 5 ccm Seifenlösung mit 6,5 ccm Globulinlösung und nahm verschiedene Mengen von diesem Gemische. Als Antigen diente ein alkoholischer Rinderherzextrakt. Das hämolytische Kaninchenserum (Titer 1 : 4000) verwendete ich in Verdünnung von 1 : 200.

*Titrierung des Komplementes in Anwesenheit des Antigens.*

| Antigen (1:150) ccm | Künstl. Kompl. (n. Titrierung) ccm | Hämolysin (1:200) ccm | Blutemulsion (5%) ccm | $^1/_2$ Std. |
|---|---|---|---|---|
| 0,1 | 0,1 | 0,5 | 0,5 | Kompl. Lösung |
| 0,1 | 0,2 | 0,5 | 0,5 | Kompl. Lösung |
| 0,1 | 0.3 | 0,5 | 0,5 | Kompl. Lösung |
| 0,1 | 0,1 | — | 0,5 | Hemmung |





Als Gebrauchsdosis des Komplementes haben wir 0,15 ccm gewählt. Was *etwas* mehr ist als die zur kompletten Hämolyse genügende Menge von 0,1 ccm.

Ein derartig angelegter Versuch einerseits mit luetischem (Wassermann positivem), andererseits mit nicht luetischem Serum, mit allen Kontrollen hat z. B. folgendes ergeben:

*Hauptversuch.*

| | Menschen-Serum (1:40) | Antigen (1:150) | Kompl. (nach Titrierung) | Hämolysin | Blut-emulsion | Luetisches (Wassermann-positives Serum) Verhalten nach Minuten: 45 | 80 | 120 | 160 | Wassermann-negatives Serum: Verhalten nach Minuten: 45 | 80 | 120 | 160 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I. | 0,25 | 0,1 | 0,15 | 0,5 | 0,5 | + | + | +— | +—— | +— | — | — | — |
| II. | 0,5 | 0,1 | 0,15 | 0,5 | 0,5 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| III. | 0,7 | 0,1 | 0,15 | 0,5 | 0,5 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| IV. | 0,25 | 0 | 0 15 | 50, | 0,5 | +— | — | — | — | +—— | — | — | — |
| V. | 0,5 | 0 | 0,15 | 0,5 | 0,5 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| VI. | 0,75 | 0 | 0,15 | 0,5 | 0,5 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| VII. | 0 | 0,2 | 0,15 | 0,5 | 0,5 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| VIII. | 0 | 0 | 0,15 | 0,5 | 0,5 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| IX. | 0 | 0 | 0,15 | 0 | 0,5 | + | + | + | + | + | + | + | + |

+ = Keine Hämolyse, — = Hämolyse, +— = beginnende Hämolyse, +—— = inkomplette Hämolyse.

Aus dem angegebenen Hauptversuche ist ersichtlich, daß in dem das positive Serum enthaltenden Röhrchen die Hämolyse sich viel später einstellt als in dem das negative Serum enthaltenden. In einem Teil meiner Versuche dauerte die Hemmung des positiven Röhrchens auch 24 Stunden, während in dem negativen Röhrchen die Hämolyse schon nach einer halben Stunde vorhanden war.

Die WaR., die mit Globulin bereiteten künstlichen Komplement vorgenommen war, fiel von 15 Fällen in 11 ebenso aus, wie wenn natürliches Komplement verwendet worden wäre: das luetische Serum zeigte Hemmung, das Wassermann-negative Lösung. In 4 Versuchen war zwischen positivem und negativem Serum kein Unterschied.

## *Zusammenfassung.*

Jene Form des künstlichen Komplementes, die aus dem Gemisch einer *wässerigen Seifen- und Globulinlösung* besteht, kann in einem Teil der Fälle das natürliche Komplement in der WaR. ersetzen. In meinen Versuchen geschah dies unter 15 Fällen 11 mal.



(Aus dem Hygienischen Institut der königl. ungar. Universität Budapest
[Direktor: Prof. *L. v. Liebermann*].)

# Die Verwendung des künstlichen Komplements bei den wichtigeren Komplementablenkungsreaktionen.

Von

Dr. **Ladislaus Scheff-Dabis.**

Da die Versuche *v. Liebermanns* und seiner Mitarbeiter[1]) bewiesen hatten, daß das frische Meerschweinchenserum bei einigen Komplementablenkungsreaktionen (Lues, Tuberkulose, Rotz) durch die sogenannten künstlichen Komplementgemische ersetzbar ist, erschien es uns notwendig, näher zu untersuchen, unter welchen Bedingungen sich ein Optimum des Ersetzens erreichen ließe.

Wie bekannt, unterscheiden sich die von *Liebermann* neuerdings zusammengestellten künstlichen Komplementgemische von den früheren in Kochsalzmedium gelösten dadurch, daß sie methylalkoholischen Lösungen von 0,1% Natriumoleinat und 0,1 proz. Chlorcalcium darstellen, denen zur Abstumpfung ihrer hämolytischen Kraft irgendein bei 56° inaktiviertes Tierserum (Kaninchen, Pferde- oder noch besser Rinderserum) in bestimmter Verdünnung und bestimmter Quantität zugesetzt wird.

*Die Zusammensetzung dieser Gemische ist folgende*:

Zu 5 ccm 0,1 proz. methylalkoholischer Natriumoleinatlösung wird 1 ccm 0,1 proz. methylalkoholische Chlorcalciumlösung zugesetzt. Von dieser vollkommen klaren Flüssigkeit nehmen wir 0,2 ccm und ermitteln die Dosis bei 56° inaktivierten, 1:10, 1:8 oder evtl. nur 1:6 verdünnten Kaninchen-, Pferde- oder Rinderserums, die notwendig ist, bei einem Gesamtvolumen von 2,5 ccm die Hämolyse von 0,5 ccm 5 proz. nicht sensibilisierter Hammelblutkörperchenemulsion innerhalb einer halben Stunde bei 37° vollkommen zu verhindern.

| Seifenmischung | Bei 56° Grad inaktiv. Rinderserum 1:10 | 5 proz. Hammelblutkörperchen-Emulsion | Phys. NaCl-Lösung | ½ stündig. Stehen im Wasserbad bei 37° |
|---|---|---|---|---|
| 0,2 | 0,1 | 0,5 | 1,7 | Lösung |
| 0,2 | 0,2 | 0,5 | 1,6 | Lösung |
| 0,2 | 0,25 | 0,5 | 1,55 | Lösung |
| 0,2 | 0,3 | 0,5 | 1,5 | Hemmung |
| 0,2 | 0,4 | 0,5 | 1,4 | Hemmung |

[1]) Dtsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 23.



Wenn wir, um für eine längere Versuchsreihe Material zu haben, zu einem bestimmten, am besten zehnfachen Multiplum, dieser durch vorstehenden Versuch gefundenen, die hämolytische Kraft von 0,2 ccm methylalkoholischem Seifengemisch eben hemmenden Serumdosis, ein bestimmtes, am besten zehnfaches Multiplum des methylalkoholischen Seifengemisches tropfenweise zusetzen, entsteht eine homogene opalescierende Flüssigkeit, die nur nach längerem Stehen einen Niederschlag absetzt. Man bereitet letztere am besten zu dem jedesmaligen Versuche frisch, da wir gefunden hatten, daß die künstlichen Komplementgemische bei längerem Stehen an Wirksamkeit einbüßen. Die Gemische sind vor Verwendung zu schütteln.

Die so vorbereiteten Gemische sind schon für Anstellung jener Vorversuche geeignet, die bei jeder Komplementablenkungsreaktion dem sog. Hauptversuch vorangehen. Schon am Anfange unserer Versuche stellte sich heraus, daß das künstliche Komplement sich mehr zur Titrierung des Komplementes als des Hämolysins eignet. Denn während die Titrierung des Komplementes mit der Promptheit und Eindeutigkeit der beim frischen Meerschweinchenserum bekannten abläuft, steht bei der Hämolysintitrierung die hämolytische Kraft mit der Konzentrationsänderung des Hämolysins nicht in einem einfachen proportionalen Verhältnis, sondern es wechseln hemmende und lösende Zonen miteinander ab. Das Gesagte wird durch 2 Versuche demonstriert:

*1. Komplementtitrierung*:

| Künstl. Kompl. | Hämolysin (1:200) | Rote Blutkörp. (5%) | Phys. NaCl | 1/2 Std. Wasserbad bei 37° |
|---|---|---|---|---|
| 0,1 | 0,5 | 0,5 | 1,4 | Hemmung |
| 0,2 | 0,5 | 0,5 | 1,3 | Hemmung |
| 0,3 | 0,5 | 0,5 | 1,2 | Lösung |
| 0,4 | 0,5 | 0,5 | 1,1 | Lösung |
| 0,5 | 0,5 | 0,5 | 1,0 | Lösung |

*Hämolysintitrierung*:

| Hämolysin (Verd. 1:1000) | Künstl. Kompl. | Phys. NaCl. | Rote Blutkörp. (5%) | Wasserbad bei 37° 20 Minuten | Wasserbad bei 37° 40 Minuten |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,1 | 0,5 | 1,4 | 1,0 | Hemmung | Hemmung |
| 0,2 | 0,5 | 1,3 | 1,0 | Lösung | Lösung |
| 0,3 | 0,5 | 1,2 | 1,0 | Hemmung | Lösung |
| 0,4 | 0,5 | 1,1 | 1,0 | Lösung | Lösung |
| 0,5 | 0,5 | 1,0 | 1,0 | Hemmung | nicht vollk. Hemung |
| 0,6 | 0,5 | 0,9 | 1,0 | Lösung | Lösung |
| 0,7 | 0,5 | 0,8 | 1,0 | Lösung | Lösung |
| 0,8 | 0,5 | 0,7 | 1,0 | Hemmung | Lösung |
| 0,9 | 0,5 | 0,6 | 1,0 | Lösung | Lösung |
| — | 0,5 | 1,5 | 1,0 | Hemmung | Hemmung |





Es schien also ratsam, in der Folge bei nicht wechselnder Hämolysindosis das Komplement zu titrieren. Als erstere verwendeten wir zu unseren Versuchen von nun an stets 0,5 ccm einer 200 fachen Verdünnung, welche sich in den in einem Gesamtvolum von $2^1/_2$ ccm eingestellten Versuchsreihen als brauchbar erwies. Sehr interessant verhielt sich das künstliche Komplement bei dem anderen wichtigen Vorversuch, bei der Titrierung des Antigens. Es stellte sich nämlich heraus, daß selbst große Dosen der verschiedenen Antigene (alkoholische und wässerige, luetische, Tuberkulose- und Rotzantigen, formaliniertes Antigen *Freunds*) das künstliche Komplement nicht ablenken, sondern im Gegenteil die lösende Wirkung des künstlichen Komplementes noch erhöhten. Zur Illustrierung dieser paradoxen Wirkung führen wir folgenden Versuch an:

| Antigen (aus Rinderherz-extr.) 1:40 | Natürl. Kompl. (frisches Meer-schweinchen-serum) 1:15 | Künstl. Kompl. (nach Titrierung) | Blutkörp. (5 %) | NaCl (Phys.) | Wasserbad bei 37° 15 Minuten | 30 Minuten |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,5 | 0,3 | — | 0,5 | 1,2 | Hemmung | Hemmung |
| 0,8 | 0,3 | — | 0,5 | 0,9 | Hemmung | Hemmung |
| 1,0 | 0,3 | — | 0,5 | 0,7 | Hemmung | Hemmung |
| 1,5 | 0,3 | — | 0,5 | 0,2 | Hemmung | Hemmung |
| 0,5 | — | 0,6 | 0,5 | 0,9 | Hemmung | Lösung |
| 0,8 | — | 0,6 | 0,5 | 0,6 | Hemmung | Lösung |
| 1,0 | — | 0,6 | 0,5 | 0,4 | nicht vollk. Hemmung | Lösung |
| 1,5 | — | 0,6 | 0,5 | — | Lösung | Lösung |

Die Lösung erfolgt also in Anwesenheit des künstlichen Komplementes in der kürzesten Zeitdauer bei der höchsten Antigendosis und nimmt der Verminderung der Antigenmengen proportional ab. Da die in unseren Versuchen verwendeten Antigenlösungen in den verschiedensten Konzentrationen (fallende Mengen von Verdünnungen 1 : 6 bis 1 : 1000) nicht sensibilisierte rote Blutkörperchen allein überhaupt nicht, sensibilisierte nur in den höchsten Konzentrationen lösten, andererseits das künstliche Komplement allein auch nicht löste, sondern nur in Anwesenheit von Antigen, müssen wir das Lösen irgend einem Zusammenwirken des Antigens und künstlichen Komplementes zuschreiben.

Diese Erscheinung könnte durch folgende Annahme erklärt werden: vom künstlichen Komplement fehlt ein Bestandteil, der die hämolytischen Fähigkeiten der Antigenlösungen abstumpft, und der in frischem Meerschweinchenserum vorhanden ist. Diese lytische Fähigkeit des Antigens nimmt ab, wenn wir es in viel höheren Verdünnungen verwenden, als dies bei den Komplementablenkungsreaktionen sonst üblich ist und es in Anwesenheit des Komplementes titrieren. Zur Illustrierung dieser Verhältnisse dienen folgende Versuche:



| Antigen (1 : 10) | Komplement nach Titrierung | Hämolyt. System | Wasserbad bei 37° ½ Std. | ¾ Std. | 1 Std. | 1¼ Std. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,05 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Hemmung | Lösung | — |
| 0,1 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Lösung | Lösung | — |
| 0,2 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Lösung | Lösung | — |
| 0,3 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Lösung | Lösung | — |
| 0,5 | 0,15 | 1,0 | Lösung | Lösung | Lösung | — |
| (1 : 400) | | | | | | |
| 0,05 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Lösung |
| 0,1 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Lösung | Lösung | Lösung |
| 0,15 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Lösung | Lösung | Lösung |
| 0,2 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Lösung | Lösung | Lösung |
| 0,3 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Lösung | Lösung | Lösung |
| 0,5 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Lösung | Lösung | Lösung |
| 1,0 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Lösung | Lösung | Lösung |
| (1 : 1000) | | | | | | |
| 0,05 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Hemmung |
| 0,1 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Hemmung | Hemmung | Lösung |
| 0,15 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Lösung | Lösung | Lösung |
| 0,2 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Lösung | Lösung | Lösung |
| 0,3 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Lösung | Lösung | Lösung |
| 0,5 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Lösung | Lösung | Lösung |
| 1,0 | 0,15 | 1,0 | Hemmung | Lösung | Lösung | Lösung |

Die Unterschiede in der lösenden Wirkung der verschieden verdünnten Antigene sind klein und nur von kurzer Dauer, aber sie sind dennoch merklich vorhanden und dieser Umstand gewinnt, wie wir später sehen werden, bei den Hauptversuchen eine gewisse Bedeutung. Um die sich gegenseitig fördernde Lösungswirkung von Antigen und künstlichem Komplement auszuschalten, nahmen wir in Anwesenheit höher verdünnten Antigens (als solches erwies sich eine Verdünnung von 1: 100 sehr brauchbar) eine Komplementtitrierung vor und stellten den Hauptversuch mit der minimallösenden Komplementdosis oder der darauf folgenden höheren ein. Um den Einwand zu widerlegen, das Antigen verliere bei so großen Verdünnungen nicht nur an lytischer Kraft, sondern büße auch seinen Antigencharakter ein, führen wir folgenden Versuch an:

*A) Versuch*:

| Antigen (1 : 10) | Luet. Serum (1 : 10) | Neg. Serum (1 : 10) | Kompl. (titrationsgemäß) | Hämolyt. System | Wasserbad bei 37° 10 Minuten | 1 Stunde |
|---|---|---|---|---|---|---|
| I. 0,1 | 0,35 | — | 0,2 | 1,0 | Lösung | — |
| II. 0,2 | 0,35 | — | 0,2 | 1,0 | Lösung | — |
| III. 0,3 | 0,35 | — | 0,2 | 1,0 | Lösung | — |
| IV. — | 0,7 | — | 0,2 | 1,0 | Hemmung | Hemmung |
| V. 0,1 | — | 0,35 | 0,2 | 1,0 | Lösung | — |
| VI. 0,2 | — | 0,35 | 0,2 | 1,0 | Lösung | — |
| VII. 0,3 | — | 0,35 | 0,2 | 1,0 | Lösung | — |
| VIII. — | — | 0,7 | 0,2 | 1,0 | Hemmung | Lösung |





*B) Versuch:*

| | Antigen (1:100) | Luet. serum (1:100) | Normalserum (1:10) | Kompl. (titrationsgemäß) | Hämolyt. System | Wasserbad bei 37° | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | $1^1/_2$ Std. | 15 Std. |
| I. | 0,2 | 0,5 | — | 0,45 | 1,0 | Hemmung | nicht vollk. Hemmung |
| II. | 0,2 | 0,6 | — | 0,45 | 1,0 | Hemmung | Lösung |
| III. | — | 0,6 | — | 0,45 | 1,0 | Lösung | Lösung |
| IV. | — | 0,7 | — | 0,45 | 1,0 | Hemmung | nicht vollk. Hemmung |
| V. | 0,2 | — | 0,5 | 0,45 | 1,0 | Lösung | Lösung |
| VI. | 0,2 | — | 0,6 | 0,45 | 1,0 | Lösung | Lösung |
| VII. | — | — | 0,6 | 0,45 | 1,0 | Lösung | Lösung |
| VIII. | — | — | 0,7 | 0,45 | 1,0 | Lösung | Lösung |

Die beiden Versuche beweisen, daß bei Verwendung der üblichen Antigenverdünnungen luetisches und Normalserum durch das künstliche Komplement nicht zu unterscheiden sind, denn in beiden Fällen fehlt die Hemmung; die Demonstration der Unterschiede gelingt sogar viel besser ohne Antigenverwendung, worauf wir unten noch zurückkommen. Die sogenannten Serumselbsthemmungskontrollen (A-Versuch, Röhrchen IV und VIII) hemmen nämlich noch nach einer Stunde (positives Serum), respektive sie lösen (negatives Serum). Dagegen war bei Verwendung höher verdünnten Antigens eine Unterscheidung von positivem und negativem Serum auch in den Antigen enthaltenden Röhrchen erreichbar. Das Röhrchen II des B-Versuches (positives Serum) hemmt noch nach $1^1/_2$ Stunden, während das Röhrchen VI desselben Versuches (negatives Serum) und die entsprechenden Serumselbsthemmungskontrollen sich lösten. In Anbetracht dessen, daß die verschiedenen Antigene das künstliche Komplement nicht ablenken, die Sera wiederum (vorwiegender die positiven als die negativen) schon in 0,05, 0,06, 0,07 cm Mengen eine starke antikomplementäre Wirkung zeigen, können wir auf die Forderung, die Serumselbsthemmungskontrolle mit der üblich doppelten Serumdosis der Antigen enthaltenden Röhrchen einzustellen, verzichten. Wenn die in den Antigenröhrchen eingestellte Serummenge mit dem Antigen bei positivem Serum hemmt (B-Versuch II. Röhrchen), dieselbe Serummenge ohne Antigen (III. Röhrchen) und bei dem negativen Serum die entsprechenden Röhrchen (VI, VII) lösen, können wir das Resultat, da auf Grund des oben Gesagten von einer Summation der Selbsthemmungswirkungen nicht die Rede sein kann, ausreichend finden. *Diese zwei Versuche zeigen, daß das Antigen in höheren Verdünnungen bei Verwendung des künstlichen Komplementes nichts von seinem Antigencharakter einbüßt, sondern durch diese für Komplementablenkungszwecke sogar geeigneter wird.*

Was die verschiedenen Hauptversuche anbelangt, so haben wir in erster Linie luetische, dann Rotz-, Tuberkulose- und Typhusserum in





unsere Untersuchungen einbezogen. Wir haben 108 luetische und 75 solche Sera untersucht, die mit natürlichem Komplement eine negative WaR. ergaben. Das Resultat der Untersuchung von 108 luetischen Seren war folgendes: 63 Sera gaben ebenso positive Reaktion wie mit Meerschweinchenkomplement, 45 Sera zeigen schon ohne Antigenzusatz Hemmung, mit Antigenzusatz jedoch Lösung.

Von 75 Wassermann-negativen Seren reagierten bei Verwendung des künstlichen Komplementes 55 negativ, 16 hemmten die Hämolyse und 4 erwiesen sich selbsthemmend.

Von 16 sonstigen Krankenseren verhielten sich 5 Tuberkulosesera, 3 Pneumoniesera, 1 polyarthritisches Serum, 1 Carcinom-, 1 Nephritis- und 2 Rotzsera mit Wassermann-Antigen negativ; 1 typhöses, 1 Scharlach- und 1 Dysenterieserum positiv. Von diesen Seren lenkte das Scharlachserum auch das natürliche Komplement ab, das typhöse und dysenterische Serum dagegen nicht. Bei den übrigen Seren war zwischen der Ablenkung der beiden Komplemente kein Unterschied. Das Schema einer WaR. mit dem künstlichen Komplemente gestaltete sich demnach folgendermaßen:

1. Das Ermitteln der die Seifenhämolyse abstumpfenden Dosis des bei 56° inaktivierten verdünnten Tierserums und auf Grund dessen die Bereitung des künstlichen Komplementes.

2. Titrierung des Komplementes in Anwesenheit des Antigens.

3. Hauptversuch.

Ad 1 verweisen wir auf den eingangs mitgeteilten Versuch, wo sich als Seifenhämolyse abstumpfende Dosis des inaktivierten 1:10 verdünnten Rinderserums 0,3 ccm ergab. Davon wird ein zehnfaches Multiplum genommen, also 3 ccm, und dem setzen wir das zehnfache Multiplum von 0,2 ccm gemischten methylalkoholischen Seifengemisches, also 2 ccm, tropfenweise zu. Von der so vorbereiteten Komplementmischung stellen wir in Anwesenheit des Antigens eine Titrierreihe ein.

*Ad 2. Titrierung des Komplementes in Anwesenheit des Antigens:*

| Antigen (alkoholischer Leberextrakt) | Künstliches Komplement | Hämolysin (1:200) | Hammelblutkörperchen (5%) | Wasserbad bei 37° ½ Std. |
|---|---|---|---|---|
| 0,15 | 0,05 | 0,5 | 0,5 | Hemmung |
| 0,15 | 0,1 | 0,5 | 0,5 | Hemmung |
| 0,15 | 0,15 | 0,5 | 0,5 | Lösung |
| 0,15 | 0,2 | 0,5 | 0,5 | Lösung |
| 0,15 | 0,25 | 0,5 | 0,5 | Lösung |
| 0,15 | 0,3 | 0,5 | 0,5 | Lösung |
| 0,15 | 0,35 | 0,5 | 0,5 | Lösung |
| 0,15 | 0,4 | 0,5 | 0,5 | Lösung |
| 0,15 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | Lösung |



Wir verwenden entweder die kleinste lösende Komplementdosis oder die darauf folgende höhere, in diesem Falle also 0,15 oder 0,2 ccm.....

*Ad 3. Der Hauptversuch.*

Zum Hauptversuche verwenden wir die zu untersuchenden Seren in verdünntem Zustand. Als Standardverdünnung erwies sich die Verdünnung von 1 : 40 sehr brauchbar, bei welcher die reagierenden Serummengen weder übergroß, noch zu klein sind. Von verdünntem Serum stellen wir mehrere Dosen ein, die zwischen 0,25—0,7 ccm schwanken. Als Serumselbsthemmungskontrolle nehmen wir die in den Antigenröhrchen eingestellte Serummenge. Von den übrigen Kontrollen erscheint die sogenannte Komplementkontrolle sehr wichtig, in welcher das künstliche Komplement die nicht sensibilisierten Blutkörperchen nicht oder nur nach längerer Zeit (nach $1^1/_2$—2 Stunden) lösen darf. Wichtig ist noch die Kontrolle des hämolytischen Systems und des Antigens. In einem eingestellten Hauptversuch fängt die Hämolyse schon nach 5—10 Minuten bei der Antigenkontrolle an, was die oben geschilderte, summierte Lösungswirkung von Antigen und künstlichem Komplement vor Augen haltend, vollkommen verständlich ist; einige Minuten darauf folgt die Lösung der Kontrolle des hämolytischen Systems, nach einer $^1/_4$—1 Stunde löst sich das negative Serum und seine Selbsthemmungskontrolle. In einer größeren Hälfte der Fälle wird die Seifenhämolyse durch das positive Serum 2—3 Stunden lang gehemmt, die Selbsthemmungskontrolle des positiven Serums löst. In einer kleineren aber immerhin beträchtlichen Anzahl der Fälle verzögert sich die Hämolyse des positiven Serums hinter der des negativen nur um 15—20 Minuten; seine Selbsthemmungskontrolle hemmt dagegen die Hämolyse eine ziemlich lange Zeit (4—5 Stunden). Es ist uns nur in einer ganz kleinen Anzahl der Fälle gelungen, die Hemmung des positiven Serums über 24 Stunden zu bewahren. Die Komplementkontrolle löst schon nach $1^1/_2$—2 Stunden, manchmal noch früher, je nach der Zusammensetzung. Untenstehend teilen wir einen Hauptversuch mit allen Kontrollen, heterologen Antigenen und Serumröhrchen mit, der der normalen WaR. entsprechende Verhältnisse zeigt, mit der auf die Mengen der Serumkontrollen sich beziehenden Beschränkung, nämlich, daß im Serumkontrollröhrchen dieselbe Menge Serum verwendet wird, wie in dem, welches das ganze System enthält.

Es gelang uns nicht vollkommen die antikomplementäre Wirkung eines Teiles der positiven Sera ohne Antigenzusatz dem künstlichen Komplement gegenüber auszuschalten, weder durch Austitrierung der in sich nicht hemmenden Dosis der fraglichen Sera, noch durch die von *Sachs*[1]) angegebene Serumglobulinbefreiung, durch die es ihm

[1]) Berl. klin. Wochenschr. 1921, Nr. 36.





*Versuch.*

| Wassermann Antigen (1:100) | Malleus Antigen (1:500) | Kochsche Alt-Tuberkulin (1:100) | Luetisches Serum (1:40) | Carcinom-Serum (1:40) | Normalserum (1:40) | Künstl. Komplement (titrationsgemäß) | Phys. NaCl (85%) | | Hämolytisches System | Wasserbad bei 87° 1 St. | 2 St. | 4 St. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,2 | — | — | 0,6 | — | — | 0,35 | 0,35 | Eine ½ Stunde Wasserbad bei 87° | 1,0 | + | + | + |
| — | — | — | 0,6 | — | — | 0,35 | 0,55 | | 1,0 | — | — | — |
| 0,2 | — | — | — | 0,6 | — | 0,35 | 0,35 | | 1,0 | — | — | — |
| — | — | — | — | 0,6 | — | 0,35 | 0,55 | | 1,0 | — | — | — |
| 0,2 | — | — | — | — | 0,6 | 0,35 | 0,35 | | 1,0 | — | — | — |
| — | — | — | — | — | 0,6 | 0,35 | 0,55 | | 1,0 | — | — | — |
| — | 0,5 | — | 0,6 | — | — | 0,35 | 0,05 | | 1,0 | — | — | — |
| — | — | — | 0,6 | — | — | 0,35 | 0,55 | | 1,0 | — | — | — |
| — | — | 0,2 | 0,6 | — | — | 0,35 | 0,35 | | 1,0 | — | — | — |
| — | — | — | 0,6 | — | — | 0,35 | 0,55 | | 1,0 | — | — | — |
| — | 0,5 | — | — | 0,6 | — | 0,35 | 0,05 | | 1,0 | — | — | — |
| — | — | — | — | 0,6 | — | 0,35 | 0,55 | | 1,0 | — | — | — |
| — | — | 0,2 | — | 0,6 | — | 0,35 | 0,35 | | 1,0 | — | — | — |
| — | — | — | — | 0,6 | — | 0,35 | 0,55 | | 1,0 | — | — | — |
| — | 0,5 | — | — | — | 0,6 | 0,35 | 0,35 | | 1,0 | — | — | — |
| — | — | — | — | — | 0,6 | 0,35 | 0,55 | | 1,0 | — | — | — |
| — | — | 0,2 | — | — | 0,6 | 0,35 | 0,35 | | 1,0 | — | — | — |
| — | — | — | — | — | 0,6 | 0,35 | 0,55 | | 1,0 | — | — | — |
| — | — | — | — | — | — | 0,35 | 0,95 | | 1,0 | — | — | — |
| — | — | — | — | — | — | 0,35 | 1,15 | | 1,0 | — | — | — |
| — | — | — | — | — | — | 0,35 | 1,65 | | 0,5 | + | + | — |

gelungen war, die Selbsthemmung vieler Sera (natürlich bei Verwendung frischen Meerschweinchenserums) aufzuheben, ohne daß letztere ihre spezifische komplementbindende Fähigkeit verloren hätten. Die Verhältnisse besserten sich auffallend, wenn wir mit *vollkommen frischen Seren* arbeiteten. Von *22 vollkommen frischen* (nach der Blutentnahme 2—3stündigen) *positiven Seren* reagierten 14 der normalen WaR. entsprechend, und nur bei 8 zeigte sich die bekannte Serumselbsthemmung. Von 22 älteren (1, 2, 3—5 Tage stehenden) positiven Seren dagegen reagierten 11 entsprechend und 11 waren selbsthemmend. Der Einfluß der Frische der Sera war noch auffallender bei den negativen Sera. Von *22 vollkommen frischen* (nach der Blutentnahme 2—3stündigen) *negativen Seren* reagierten 18 negativ und nur 4 hemmten. Selbsthemmend war keines. Von 21 gestandenen (1, 2, 3—5 Tage alten) negativen Seren verhielten sich nur 6 entsprechend negativ, 10 hemmten die Hämolyse und 5 waren selbsthemmend. Letztere stammten von jenen Sera, die 3—5 Tage gestanden hatten. Das Gesagte wird durch folgenden Versuch illustriert:

| Antigen (1:100) | Frisches luetisches Serum (1:40) | 2 Tage altes luetisch. Serum (1:40) | Frisches norm. Serum (1:40) | 3 Tage altes norm. Serum (1:40) | Phys. NaCl (0,85%) | Künstl. Kompl. (nach Titr.) | Hämolytisches System | Wasserbad bei 37° | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | 1 Stunde | 2 Stunden | 3 Stunden |
| 0,2 | 0,6 | — | — | — | 0,35 | 0,35 | 1,0 | Hemm. | Hemm. | Hemm. |
| — | 0,6 | — | — | — | 0,35 | 0,35 | 1,0 | Lösung | Lösung | Lösung |
| 0,2 | — | 0,6 | — | — | 0,35 | 0,35 | 1,0 | Hemm. | Hemm. | Lösung |
| — | — | 0,6 | — | — | 0,55 | 0,35 | 1,0 | Hemm. | Hemm. | Hemm. |
| 0,2 | — | — | 0,6 | — | 0,35 | 0,55 | 1,0 | Lösung | Lösung | Lösung |
| — | — | — | 0,6 | — | 0,55 | 0,35 | 1,0 | Lösung | Lösung | Lösung |
| 0,2 | — | — | — | 0,6 | 0,35 | 0,35 | 1,0 | Hemm. | Hemm. | Hemm. |
| — | — | — | — | 0,6 | 0,55 | 0,35 | 1,0 | Hemm. | Hemm. | Hemm. |

Das künstliche Komplement zeigt also eine große Empfindlichkeit jenen sehr feinen Änderungen gegenüber, die so in den positiven wie den negativen Seren beim Stehen vor sich gehen und die in Anbetracht dessen, daß diese Versuche beim Einhalten aller Sterilitätskautelen vorgenommen wurden, keineswegs fäulnis-bakterieller, sondern nur kolloidaler Natur sein können, die eventuell den Anstoß zum Studium jener feineren kolloidalen Verhältnisse geben können, die bisher durch das Arbeiten mit dem vollkommeneren und eine größere Wirkungsbreite besitzenden natürlichen Komplemente vor uns verdeckt blieben. Diese große Empfindlichkeit des künstlichen Komplementes den feineren und vor uns unbekannten Verhältnissen der verschiedenen Sera gegenüber beweisen auch jene Fälle, wo das künstliche Komplement bei den behandelten Fällen (die meist mit + oder ++ bezeichnet werden, im Gegensatze zu +++ oder ++++) sich empfindlicher erwies als das natürliche, wo letzteres schon Lösung oder nur schwache Hemmung zeigte, wo das künstliche Komplement die Hämolyse stark hemmte. Bei den vollkommen normalen und frischen Blutsera dagegen deckte sich gegenseitig das Resultat des Arbeitens mit beiden Komplementen. Diese Verhältnisse haben wir aber nicht näher studiert.

In einer kleineren Gruppe unserer Versuche studierten wir das Verhalten des künstlichen Komplementes bei der Rotz-, Tuberkulose- und Typhuskomplementablenkung. Wir untersuchten 20 Sera von rotzkranken Pferden, von denen sich 9 der *Schütz-Schubert*schen Reaktion entsprechend verhielten, 7 dagegen nicht hemmten und 4 selbsthemmend waren. Von 20 nicht rotzigen Pferdesera reagierten 12 negativ, 3 hemmten und 5 waren selbsthemmend.

Das Ersetzen des frischen Meerschweinchenkomplementes durch künstliches geschieht bei der *Schütz-Schubert*schen Reaktion nach Innehaltung fast derselben Bedingungen wie bei der WaR. Das Malleusantigen (die übliche Kochsalzbacillenemulsion) fördert auch hier die

lösende Wirkung des künstlichen Komplementes und ist dementsprechend in größerer Verdünnung und nach Titrierung mit dem Komplemente zusammen zu verwenden. Die starke selbsthemmende Wirkung der Pferdesera bemühten wir uns durch Erhitzen der Sera auf 60° auszuschalten, welches anstatt der Inaktivierung bei 56° in der tierserologischen Praxis schon Bürgerrecht gewonnen hat. Die Pferdesera wurden auch hier in verdünntem Zustande verarbeitet, und zwar erwiesen sich die Mengen 0,1 und 0,05 ccm von der Verdünnung von 1:10 als die optimalsten. Obzwar diese bedeutend kleiner sind als jene (0,2, 0,1 0,05, und 0,02 ccm von dem unverdünnten Serum), worauf nach dem Erlasse des preußischen Landwirtschaftlichen Ministeriums die ganze Rotzdiagnose fußt, so macht, wenn ein großer Teil der untersuchten normalen Pferdesera in denselben Mengen ein negatives Resultat ergibt, die Diagnose doch nicht unmöglich, und dies kann wieder als Beweis für die größere Empfindlichkeit des künstlichen Komplementes in manchen Fällen gelten. Wir lassen einen unserer Versuche hier folgen:

| Rotzbacillenemulsion (1:1000) | Rotz-Serum (1:10) | Norm. Pferde-Serum (1:10) | Künstl. Kompl. (Mit Titr.) | Phys. NaCl (0,85) | Hämolyt. System | Im Wasserbad bei 37° | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | ½ Stunde | 2 Stunden |
| 0,5 | 0,1 | — | 0,3 | 0,7 | 1,0 | Hemmung | Hemmung |
| 0,5 | 0,05 | — | 0,3 | 0,75 | 1,0 | Hemmung | Hemmung |
| — | 0,1 | — | 0,3 | 1,1 | 1,0 | Hemmung | Hemmung |
| — | 0,05 | — | 0, 3 | 1,15 | 1,0 | Lösung | Lösung |
| 0,5 | — | 0,1 | 0,3 | 0,7 | 1,0 | Lösung | Lösung |
| 0,5 | — | 0,05 | 0,3 | 0,75 | 1,0 | Lösung | Lösung |
| — | — | 0,1 | 0,3 | 1,1 | 1,0 | Hemmung | Lösung |
| — | — | 0,05 | 0,3 | 1,15 | 1,0 | Lösung | Lösung |
| — | — | — | 0,3 | 1,2 | 1,0 | Lösung | Lösung |

Frische Pferdesera von rotzkranken Tieren standen uns nicht zur Verfügung, so daß unsere Versuche in dieser Richtung hin noch der Ergänzung bedürfen. Von Tuberkulosesera untersuchten wir parallel mit künstlichem und natürlichem Komplement 7, bei 56° inaktivierte und 3 aktive Sera. In aktivem Zustande deshalb, weil nach den Untersuchungen von *Davidovics*[1]) die Komplementablenkung mit aktivem Serum besser gelingt als mit inaktiviertem. Als Antigen benützten wir das *Koch*sche Alttuberkulin. Von 7 inaktiven Seren ergaben mit natürlichem Komplement nur 5 Hemmung und 2 verhielten sich negativ. Von jenen 5 reagierten beim Ersetzen mit künstlichem Komplement nur 4 positiv, während von den 2 negativen bei Verwendung des künstlichen Komplementes 1 Hemmung ergab. Die tuberkulotischen Sera hemmten die Hämolyse in aktivem Zustande, aber die zur Kontrolle verwendeten Normalsera hemmten gleichfalls in aktivem Zustande ver-

[1]) Dtsch. med. Wochenschr. 1914, Nr. 1.



wendet, mit künstlichem Komplement und Tuberkuloseantigen die Hämolyse, dagegen reagierten die 5 inaktivierten normalen mit Tuberkuloseantigen und künstlichem Komplement negativ. Das Ersetzen des natürlichen Komplementes durch künstliches gelingt bei Tuberkulose also nur mit inaktivierten Seren. Wegen der hauptsächlich theoretischen Bedeutung der Tuberkulosekomplementablenkung haben wir auf eine größere Versuchsanzahl verzichtet. Als Paradigma führen wir hier eine von den gelungenen Versuchsreihen an. Die Versuchsdauer ist hier eine bedeutend längere als die bei Luesversuchen.

| Antigen (1:100) (Alt-Tuberk.) | Aktiv. Tuberkul.-Serum (1:10) | Aktiv. Normal-Serum (1:10) | Inaktiv. Tuberkul.-Serum (1:10) | Inaktiv. Normal-Serum (1:10) | NaCl | Komplem. (titrationsgemäß) | Hämolyt. System | Wasserbad bei 37° 16 Stunden |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,1 | 0,5 | — | — | — | 0,3 | 0,6 | 1,0 | Hemmung |
| — | 0,5 | — | — | — | 0,4 | 0,6 | 1,0 | Hemmung |
| 0,1 | — | 0,5 | — | — | 0,3 | 0,6 | 1,0 | Hemmung |
| — | — | 0,5 | — | — | 0,4 | 0,6 | 1,0 | Hemmung |
| 0,1 | — | — | 0,5 | — | 0,3 | 0,6 | 1,0 | Hemmung |
| — | — | — | 0,5 | — | 0,4 | 0,6 | 1,0 | Lösung |
| 0,1 | — | — | — | 0,5 | 0,3 | 0,6 | 1,0 | Lösung |
| — | — | — | — | 0,5 | 0,4 | 0,6 | 1,0 | Lösung |

Zur Demonstrierung, daß der Nachweis des Typhusantikörpers auch mit künstlichem Komplemente gelingt, haben wir 6 solche Typhussera untersucht, die mit natürlichem Komplemente positive Reaktion zeigten. Von diesen 6 Seren erzielten wir mit künstlichem Komplement nur 2 positive Resultate, was wir aber in Anbetracht dessen, daß in den mit Normalserum angestellten Kontrollen die Hemmung fehlte, von theoretischem Standpunkte aus für wichtig halten müssen.

Als Antigen benützten wir eine bei 56° getötete Typhusbacillenemulsion, die durch das Abwaschen des üblichen Schrägagarröhrchens mit 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung gewonnen und in einer Verdünnung von 1:10 gebraucht wurde. Das Verhalten des Typhusantigens dem künstlichen Komplement gegenüber wich von den üblichen Antigenen durch das Vorhandensein einer selbsthemmenden Wirkung ab. Im Versuche benützten wir daher etwas weniger als die Hälfte der selbsthemmenden Dosis.

*Versuch.*

| Getöt. Typhusbacillenemuls. (titr. gemäß) (1:10) | Typhusserum Inaktiviert. (1:40) | Normalserum Inaktiviert (1:40) | Künstl. Kompl. (titr. gemäß) | NaCl | Hämolytisch. System | Wasserbad bei 37° 8 St. | Wasserbad bei 37° 12 St. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0,1 | 0,6 | — | 0,3 | 0,5 | 1,0 | Hemmung | Hemmung |
| — | 0,6 | — | 0,3 | 0,6 | 1,0 | Hemmung | Lösung |
| 0,1 | — | 0,6 | 0,3 | 0,5 | 1,0 | Hemmung | Lösung |
| — | — | 0,6 | 0,3 | 0,6 | 1,0 | Hemmung | Lösung |



Aus all den mitgeteilten Versuchen geht hervor, daß das sog. künstliche Komplement (Seifengemisch) dem natürlichen auch darin entspricht, daß es durch entsprechende Antigenantikörpersysteme in spezifischer Weise gebunden werden kann, womit aber noch nicht gesagt ist, daß es in dieser Form das Meerschweinchenkomplement in der Praxis vollwertig ersetzen könnte, wie das schon *Liebermann* (l. c.) ausgesprochen hat. Immerhin habe ich den Eindruck, daß das künstliche Komplement wegen seiner großen Empfindlichkeit bestimmten Serumveränderungen gegenüber, in zweifelhaften Fällen zur Orientierung herangezogen werden könnte.

### *Zusammenfassung.*

1. Das frische Meerschweinchenserum ist bei den verschiedenen Komplementablenkungsreaktionen (Lues, Malleus, Tuberkulose, Typhus) in einem Teil der Fälle und unter gewissen Bedingungen durch das *Liebermann*sche neue, in methylalkoholischem Medium gelöste künstliche Komplement ersetzbar.

2. Das künstliche Komplement ist geeigneter zur Komplement- als zur Hämolysintitrierung.

3. Die üblichen Verdünnungen der verschiedenen Antigenlösungen (mit Ausnahme des Typhusantigens) erhöhen die lösende Wirkung des künstlichen Komplementes. Zur Verminderung dieser ist die Verwendung höher verdünnter Antigenlösungen zweckmäßig.

4. Der größere Teil der positiven Sera — dies bezieht sich hauptsächlich auf luetische, ferner auf Rotz- und auch auf einige Typhus- und Tuberkulosesera — lenkt mit dem entsprechenden homologen Antigen das künstliche Komplement ab. Ein kleinerer Teil zeigt Selbsthemmung, und bei diesen war durch Zusatz des entsprechenden Antigens die Unterscheidung der positiven und negativen Sera nicht erreichbar. Der größte Teil der negativen Sera lenkt das künstliche Komplement nicht ab.

5. Die Verwendung ganz frischer (nach der Blutentnahme 2—3stündiger) Sera erhöht bedeutend die gegenseitige Ersetzbarkeit des natürlichen und künstlichen Komplementes; die Verwendung älterer, manchmal nur einen Tag alter, setzt sie bedeutend herab.

6. In dem größeren Teil der Fälle dauert die Hemmung der Hämolyse nur einige Stunden, *manchmal ist sie nur eine verspätete Lösung*; in einem kleineren Teil der Fälle bleibt die Hemmung des positiven Serums über 24 Stunden bestehen, gegenüber der schon nach einer halben Stunde eingetretenen Lösung des negativen Serums.

7. Das künstliche Komplement besitzt schwachpositiven Seren gegenüber eine größere Empfindlichkeit als das natürliche und könnte daher in zweifelhaften Fällen zur Orientierung herangezogen werden.



(Aus dem Institut „Robert Koch“ [Abt.-Leiter: Dr. *O. Schiemann*].)

# Untersuchungen über Pneumokokkenimmunität.

## III. Mitteilung.

## Versuche über Schutzimpfung von Mäusen (Meerschweinchen und Kaninchen).

Von

Prof. **M. Yoshioka,** Tokio.

### 1. Weitere Versuche über aktive Immunisierung von Mäusen gegen heterologe Pneumokokken.

Ich habe in der ersten Mitteilung[1]) nachgewiesen, daß bei aktiver Immunisierung gegen Pneumokokken durch Vorbehandlung mit abgetöteten virulenten Kulturen vom Typus I eine Immunität nicht nur gegen eine Pneumokokkeninfektion mit Typus I erzielt wird, sondern auch, wenn auch in geringem Grade, gegen Infektion mit Typus II und ebenso umgekehrt bei aktiver Immunisierung mit Pneumokokken vom Typus II (abgetötete virulente Kulturen) eine gewisse Immunität auch gegenüber einer Infektion mit Typus I.

Ich habe nun weitere Immunisierungsversuche, und zwar zunächst mit *lebenden* Kulturen bei Mäusen angestellt. Die dafür benutzten Mäuse wurden zunächst mit abgetöteten virulenten Kulturen (in 3 Fällen statt dessen mit avirulenten lebenden Kulturen vom Typus I und in einem Falle mit avirulenten lebenden Streptokokken) vorbehandelt, dann mit lebenden Erregern weiter immunisiert und schließlich auf Immunität gegen heterologe Pneumokokken geprüft (S. 387, Tab. I).

Die Gesamtmenge des Impfmateriales betrug bei der ersten Vorbehandlung 3,0 ccm Bouillonkultur bis auf einen Fall (Nr. 2), wo die doppelte Menge angewandt wurde. In diesem Falle wurden alle 7 Tage steigende Dosen (1, 2 und 3 ccm) injiziert, in der Regel dagegen an drei aufeinander folgenden Tagen je 1 ccm. In Versuch 5 und 6 wurde die ganze Impfstoffmenge an einem Tage in 6 Einzeldosen halbstündlich injiziert. Die abgetöteten Streptokokken wurden dreimal in Zwischenräumen von 8—9 Tagen in gleichen Mengen (je 1 ccm) gegeben.

In die Tabelle sind nur diejenigen Tiere aufgenommen, die die erste Impfung mit lebender Kultur überstanden. Es sind daher fast nur solche, die mit dem gleichen Typ., mit dem sie vorbehandelt waren, injiziert wurden. Jedoch überlebten auch einige mit heterologen Typen infizierte Tiere die 1. Prüfung (Nr. 4

[1]) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **96**, 520.



*Tabelle I. Aktive Immunisierung von Mäusen gegen Pneumokokken.*
Vorbehandlung erst mit totem, dann mit lebendem Material, Nachprüfung mit *heterologem* Stamm.

| Nr. | Vorbehandlung mit toten oder avirulenten Erregern | | Vorbehandlung mit lebender Kultur | | Infektion | | Erfolg | Sektionsbefund |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Gesamtmenge u. Typ. | Impfdauer u. Dosier. | erste nach | zweite nach | nach | mit | | |
| 1 | 3 ccm tote, virul. I (Wa.) | 3 Tage, je 1 ccm täglich | 21 Tagen 0,00001 Wa. | 62 (41) Tagen 0,000001 Wa. | 4 Tagen | 0,0000001 Am. II (heterol.) | lebt | Nach 4 Tagen getöt. In Blut, Milz sp. Pn. II |
| 2 | 6 ccm tote, virul. I (Am. I) | 14 Tage, je 1, 2, 3 ccm alle 7 Tg. | · | 19 Tagen 0,00001 Am. I | 3 „ | 0,00001 Am. II (heterol.) | „ | · |
| 3 | 3 ccm tote, virul. I (Wa.) | 3 Tage, je 1 ccm täglich | 24 Tagen 0,00001 Am. I | 62 (38) Tagen 0,000001 Wa. | 4 „ | 0,0000001 Am. III (heterol.) | „ | · |
| 4 | 3 ccm tote, virul. II (Am. II.) | dgl. | · | 20 Tagen 0,0000001 Wa. | 4 „ | dgl. | „ | · |
| 5 | 3 ccm tote, virul. I (Wa.) | 1 Tag, 6×1/2 stündl. je 0,5 ccm | · | 26 Tagen 0,00001 Wa. | 3 „ | 0,001 Wa. (homolog) | „ | · |
| 6 | dgl. | dgl. | 26 Tagen 0,000001 Am. II | 64 (38) Tagen 0,000001 Wa. | 4 „ | 0,000001 Am. I (homolog) | „ | · |
| 7 | 3 ccm avir. lebende I (Am. I) | 3 Tage, je 1 ccm täglich | · | 16 Tagen 0,000001 Am. I | 9 „ | 0,000001 Am. II (heterol.) | † | Pn. Am. II |
| 8 | dgl. | dgl. | · | dgl. | 9 „ | 0,0000001 Am. II (heterol.) | verzögert tot | dgl. |
| 9 | dgl. | dgl. | · | dgl. | 9 „ | 0,0000001 Am. III (heterol.) | lebt | · |
| 10 | 3 ccm tote, virul. I (Am. I) | dgl. | · | 17 Tagen 0,00001 Wa. | 14 „ | 0,00001 Am. II (heterol.) | „ | Nach 5 Tagen getöt. Blut, Organe steril. |
| 11 | dgl. | dgl. | · | dgl. | 14 „ | 0,000001 Am. II (heterol.) | † | · |
| 12 | dgl. | dgl. | · | 17 Tagen 0,00001 Am. I | 14 „ | dgl. | lebt | Nach 6 Tagen getöt. Blut, Organe steril. |
| 13 | 3 ccm tote, virul. Streptok. (Ar.) | 17 Tage, je 1 ccm am 1., 8. und 17. Tag | · | 14 Tagen 0,0000001 Am. I | 14 „ | 0,000001 Am. III (heterol.) | „ | · |
| 14 | dgl. | dgl. | · | 14 Tagen 0,00001 Streptok. Ar. | 14 „ | dgl. | † | Pn. Am. III |
| 15 | 3 ccm avirul. lebende Streptok. (Ar.) | 3 Tage, je 1 ccm täglich | · | 14 Tagen 0,0000001 Strept. Ar. | 14 „ | 0,000001 Am. I (heterol.) | † | Pn. Am. I |

und 6), ja auch ein mit Streptokokken vorbehandeltes und mit Pneumokokkus Am. I geprüftes Tier (Nr. 13). In diesen 3 Fällen war vorsichtshalber eine geringere Dosis zur Infektion gewählt worden: 0,000001 in Fall 6, wo mit dem gut immunisierenden Pneumokokkus Wa. vorbehandelt worden war und nur 0,0000001 in den beiden anderen Fällen. Bei den mit avirulenten Pneumokokken bzw. Streptokokken vorbehandelten Tieren wurden zur Infektion ebenso geringe Dosen gewählt, während in 7 Fällen, wo mit virulenten, abgetöteten Pneumokokken gegen den homologen Typ. und in 1 Falle, wo mit Streptokokken vorbehandelt war, die Dosis 0,00001 Pneumokokkus Wa. oder Am. I bzw. Streptokokkus Aronson angewandt wurde. Wie später ausgeführt wird, erhält man nämlich mit abgetöteten virulenten Pneumo- und Streptokokken weit besseren Schutz als mit avirulenten lebenden.

Die erste Prüfung mit lebender Kultur erfolgte 14—26 Tage nach Abschluß der Schutzimpfung; 3—14 Tage später erfolgte die zweite Prüfung meist mit heterologen Typen (Am. II und III).

3 Tiere (Nr. 1, 3 und 6) sind dreimal mit lebender Kultur geprüft worden. Diese Tiere sind bei Berechnung der durch Vorbehandlung mit lebender Kultur erreichten Erfolge doppelt zu zählen. Sie zeigen eine ziemlich lange (38—41 Tage) währende Immunität. Bei den vor der letzten Prüfung mit heterologen, lebenden Pneumokokken (bzw. Streptokokken) behandelten Tieren scheint die Immunität bald abzuklingen. Vier nach 3—4 Tagen meist mit kleinen, einmal (Nr. 2) mit einer größeren Dosis (0,00001) der Pneum. II und III geprüfte Tiere überleben sämtlich. Von zwei mit Am. II nach 9 Tagen geprüften Tieren stirbt ein mit der Dosis 0,0000001 infiziertes Tier mit einer Verzögerung um 1 Tag gegenüber den Kontrollen, während das mit zehnmal größerer Dosis infizierte Tier gar keinen Schutz zeigt. Von drei 14 Tage nach der letzten Infektion ebenfalls mit Am. II geprüften Tieren stirbt ein mit 0,000001 infiziertes Tier mit den Kontrollen, ein anderes mit der gleichen Dosis und diesmal auch ein mit der zehnmal größeren Dosis infiziertes Tier (Nr. 10) bleiben am Leben. Mit Stamm Am. III wurden nach 2 und 14 Tagen nur je 1 Tier geprüft (Nr. 9 und 13), die überlebten.

Die gegen Streptokokken immunisierten Tiere Nr. 14 und 15 erwiesen sich nicht geschützt gegen eine Infektion mit 0,000001 Am. I bzw. III 14 Tage nach der Prüfung mit Streptokokken. Doch war die Dosis hier wohl etwas zu hoch gewählt. Da 14 Tage nach Immunisierung mit abgetöteten Streptokokken Tier Nr. 13 sich gegen eine Dosis von 0,0000001 Am. I immun erwies, so ist es nicht unwahrscheinlich, daß wir bei Wahl dieser Dosis auch bei Tier Nr. 14 oder 15 noch eine Immunität gegen Pneumokokken hätten nachweisen können.

Eine Übersicht über die Ergebnisse gibt folgende Zusammenstellung, in der die 3 zweimal mit lebender Kultur vorbehandelten Mäuse doppelt gezählt sind.

*Übersichtstabelle.*

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vorbeh. | mit | leb. | homol. | Pneum., | Nachprüfung | nach | 3—4 | Tagen: | 2:2 |
| „ | „ | „ | „ | „ | „ | „ | 38—41 | „ | 2:2 |
| „ | „ | „ | heter. | „ | „ | „ | 3—4 | „ | 4:4 |
| „ | „ | „ | „ | „ | „ | „ | 9—14 | „ | 7:4 |
| „ | „ | „ | „ | „ | „ | „ | 38 | „ | (1:1?)[1] |
| „ | „ | Streptokokken, | | | „ | „ | 14 | „ | 2:0 |

7:4 bedeutet: von 7 Tieren überleben 4.

[1]) In diesem Fall ist es fraglich, ob die Immunität nicht auf die erste Vorbehandlung mit abgetöteter homologer Kultur zu beziehen ist.



Um die Tatsache des Schutzes gegen heterologe Pneumokokken weiter zu sichern und besonders auch den Grad des durch Vorbehandlung mit lebender Kultur erzielten Schutzes festzustellen, habe ich einige weitere systematische Versuche angestellt. Die Mäuse wurden mit abgetöteten Kulturen von Typus I (*Wachholz*) vorbehandelt und in 3 Gruppen geteilt. Nach Ablauf von 2 Wochen wurde die eine Gruppe mit dem homologen Typus, die andere mit dem heterologen Typus infiziert, und zwar mit sehr kleinen Dosen (0,0000001); die dritte Gruppe erhielt zunächst keine weitere Injektion. Nach Ablauf weiterer 4 Tage wurden alle 3 Gruppen mit einer 10-, 100- bzw. 1000fach größeren Menge des Typus I (*Wachholz*) (0,0001—0,000001) infiziert (Tab. II). In ganz derselben Weise wurden wiederum 3 Gruppen von Mäusen vorbehandelt und dieses Mal mit Am. II (in einer Dosis von 0,00001 bis 0,0000001) infiziert (Tab. III).

*Tabelle II. Prüfung der Immunität von Mäusen gegen Pneum. I 4 Tage nach Behandlung mit lebenden (homologen bzw. heterologen) Pneumokokken.*

Kontrollmäuse mit 0,000001 und 0,00000001 starben in 2 Tagen.

| Vorbehandlung i. p. mit abgetöteter Kultur Wa. (Typ. I) | Vorbehandlung i. p. nach 14 Tagen mit lebenden Pneum. | Nach 4 Tagen Infektion i. p. mit Pneum. Wa. (Typ. I) | | | Es überleben: |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 0,0001 | 0,00001 | 0,000001 | |
| In 1 Tage 3 ccm | Wa. (Typ. I) | $+_1$ | 0 | · | 4 : 3 |
| (6 × 1/2 stündlich je 0,5 ccm) | (0,0000001) | 0 | 0 | | |
| dgl. | Am. II (Typ. II) | $+_1$ | $+_1$ | 0 | 6 : 4 |
| | (0,0000001) | 0 | 0 | 0 | |
| dgl. | · | $+_2$ | $+_2$ | $+_2$ | 6 : 2 |
| | · | $+_2$ | 0 | 0 | |

*Tabelle III. Prüfung der Immunität von Mäusen gegen Pneum. II 4 Tage nach Behandlung mit lebenden (homologen bzw. heterologen) Pneumokokken.*

Kontrollen mit 0,0000001 und 0,00000001 Am. II starben in 2 Tagen.

| Vorbehandlung i. p. mit abgetöteter Kultur Wa. (Typ. I) | Vorbehandlung i. p. nach 14 Tagen mit lebenden Pneum. | Nach 4 Tagen Infektion i. p. mit Pneum. Am. II (Typ. II) | | | Es überleben: |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 0,00001 | 0,000001 | 0,0000001 | |
| In 1 Tage 3 ccm | Wa. (Typ. I) | 0 | 0 | 0 | 6 : 6 |
| (6 × 1/2 stündlich je 0,5 ccm) | (0,0000001) | 0 | 0 | 0 | |
| dgl. | Am. II (Typ. II) | 0 | 0 | 0 | 6 : 6 |
| | (0,0000001) | 0 | 0 | 0 | |
| dgl. | · | $+_2$ | $+_2$ | 0 | 6 : 2 |
| | | $+_2$ | $+_2$ | 0 | |

Wie Tab. II zeigt, ergibt die Immunisierung nur mit abgetöteten Kulturen (Kontrollen) einen deutlichen, aber doch unvollkommenen

Schutz gegen den homologen Stamm *Wachholz*: Von 6 Tieren blieben nur 2 am Leben, und zwar je eines der mit den kleinsten Dosen geprüften. Bei einer Vorbehandlung mit lebenden Kulturen des homologen Typus dagegen stirbt nur 1 Tier, das mit der größten Dosis infiziert wurde, aber auch bei Vorbehandlung mit dem heterologen Typus (Am. II) sterben nur 2 von 6 Mäusen. Hier ist also der Erfolg nur wenig schlechter als bei homologer Kultur.

In der zweiten Versuchsreihe (Tab. III) wurde mit 10fach kleineren Dosen des Pneumokokkus Am. II nachgeprüft. Hier blieben von den 6 Tieren, die nur mit abgetöteten Wachholz-Kulturen vorbehandelt waren (Kontrollen) nur die beiden mit der kleinsten Dosis (0,0000001) am Leben; der Schutz war also auch gegenüber den heterologen Erregern deutlich ausgesprochen, aber (trotz der kleineren Infektionsdosen und der geringeren Virulenz des Pneu. Am. II) noch geringer als gegenüber den homologen (in Tab. II). Dagegen zeigten die 12 außerdem mit lebenden Kulturen vorbehandelten Mäuse sich sämtlich immun gegen die gewählte Infektion mit Pneumokokkus Am. II, und zwar diejenigen, die lebende Pneumokokken vom Typ. I erhalten hatten ebenso wie die mit dem (homologen) Typ. II behandelten. Ob letztere bei höherer Infektionsdosis doch einen stärkeren Grad von Immunität gezeigt hätten, muß dahingestellt bleiben. Auch die wichtige Frage, inwieweit sich bezüglich der Dauer der Immunität ein Unterschied zwischen Vorbehandlung mit homologen und heterologen Kulturen ergibt, bedarf weiterer Prüfung.

Aus diesen Versuchen geht erstens wiederum hervor, daß ein Schutz sowohl gegen heterologe wie homologe Kulturen besteht, und zweitens daß durch einmalige Immunisierung mit sehr kleinen Dosen von lebenden Kulturen eine weit stärkere Immunität erzielt werden kann als durch Vorbehandlung mit abgetöteten Kulturen, wenigstens wenn die Nachprüfung nach sehr kurzer Zeit erfolgt. Vielleicht liegen aber bei der Prüfung 4 Tage nach erfolgter Infektion besondere Verhältnisse vor.

Über die Dauer dieser durch Impfung mit lebender Kultur erzeugten Immunität haben wir bisher keine systematischen Versuche gemacht. Aus Tab. I geht hervor, daß die Impfung mit lebender Kultur gegenüber homologer Infektion noch nach langer Zeit (38 bis 41 Tage) einen Schutz verleihen kann. Dagegen erwies sich die Immunität gegen heterologe Erreger nach 9—14 Tagen bereits geringer als nach 4 Tagen.

Die folgende Tabelle zeigt, daß 14 Tage nach einmaliger Vorbehandlung mit einer mittleren Dosis lebender heterologer Pneumokokken (0,0001 und 0,00001 Pn. Wa.) keine stärkere Immunität gegenüber Am. II-Pneumokokken mehr nachweisbar war.



Zu diesen Versuchen wählten wir 9 von simultaner Impfung mit Pneumokokken Wa. und dem homologen Serum (Typ. I) überlebende Tiere. Dieselben wurden 7—14 Tage nach der simultanen Impfung teils mit großen, teils mit kleinen Dosen lebender Pneumokokken Wa. weiterbehandelt. Sämtliche Tiere überlebten. Die ersten 4 Tiere davon wurden nun 4 Tage, die anderen 5 Tiere 14 Tage später einer Prüfung mit 0,00001 bzw. 0,000001 des heterologen Pneum. Am. II unterworfen. Die Tiere der ersten Gruppe überstanden sämtlich die Infektion mit dem heterologen Typ, die der zweiten Gruppe erlagen ihr sämtlich ohne Verzögerung. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Tiere der ersten Gruppe mit 100 mal größeren Dosen lebender Kultur vorbehandelt waren; es muß also dahingestellt bleiben, ob das kürzere Intervall oder die intensivere Vorbehandlung den besseren Erfolg bedingt hat.

Wie die Tabelle weiter zeigt, wurden die 4 nach Prüfung mit Am. II überlebenden Tiere der ersten Gruppe nach weiteren 4 Tagen mit Am. III infiziert (je 2 Tiere mit 0,00001 und 0,000001 ccm), wobei nur 1 Tier gerettet wurde, das mit der kleineren Dosis infiziert war; ein mit der größeren Dosis infiziertes starb um 2 Tage

*Tabelle IV. Prüfung der Immunität von Mäusen nach Vorbehandlung mit lebenden heterologen Pneumokokken.*

| Nr. | Simultan-Vorbehandlung durch i. p. Injektion eines Gemisches von Immunserum + Kultur (Typ. I) | 1. Infektion i. p. mit Typ. I nach | Kulturdosis | 2. Infektion i. p. mit Typ. II nach | Kulturdosis | Erfolg | 3. Infektion i. p. mit Typ. III nach | Kulturdosis | Erfolg |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 22. VIII. 0,2 I.S. + 0,2 Wa. | 7 Tagen | 0,1 Pn.Wa. | 4 Tagen | 0,00001 Am.II | lebt | 4 Tagen | 0,00001 Am.III | $\dagger_3$ |
| 2 | 22. VIII. 0,2 I.S. + 0,2 Wa. | 7 „ | 0,1 „ | 4 „ | 0,00001 Am.II | „ | 4 „ | 0,00001 Am.III | $\dagger_1$ |
| 3 | 18. VIII. 0,02 I.S. + 0,2 Wa. | 11 „ | 0,001 „ | 4 „ | 0,000001 Am.II | „ | 4 „ | 0,000001 Am.III | lebt |
| 4 | 15. VIII. 0,0002 I.S. + 0,001 Wa. | 14 „ | 0,001 „ | 4 „ | 0,000001 Am.II | „ | 4 „ | 0,000001 Am.III | $\dagger_2$ |
| | Zusammen: | 4 : 4 | | · | | 4 : 4 | · | | 4 : 1 (1) |
| 5 | 22. VIII. 0,00002 I.S. + 0,0001 Wa. | 11 Tagen | 0,0001 Wa. | 14 Tagen | 0,00001 Am.II | $\dagger_2$ | · | | · |
| 6 | 22. VIII. 0,00002 I.S. + 0,00001 Wa. | 11 „ | 0,00001 Wa. | 14 „ | 0,00001 Am.II | $\dagger_2$ | · | | · |
| 7 | 22. VIII. 0,00002 I.S. + 0,00001 Wa. | 11 „ | 0,00001 Wa. | 14 „ | 0,000001 Am.II | $\dagger_2$ | · | | · |
| 8 | 22. VIII. 0,00002 I.S. + 0,00001 Wa. | 11 „ | 0,00001 Wa. | 14 „ | 0,000001 Am.II | $\dagger_2$ | · | | · |
| 9 | 22. VIII 0,00002 I.S. + 0,00001 Wa. | 11 „ | 0,00001 Wa. | 14 „ | 0,000001 Am.II | $\dagger_2$ | · | | · |
| | Zusammen: | 5 : 5 | | · | | 5 : 0 | · | | · |





verzögert. Der Versuch fiel ungünstiger aus als der in Tab. I, wo sämtliche mit Am. III geprüften Tiere geschützt waren; damals wurden aber kleinere Dosen Am. III zur Infektion benutzt.

### 2. Versuche, Mäuse mit Streptokokken (und Staphylokokken) gegen Pneumokokken zu immunisieren und umgekehrt.

Wir haben nun, ausgehend von den in meiner ersten Mitteilung besprochenen Beobachtungen von *Cecil* und *Austin*, wonach gegen Pneumokokken geimpfte Soldaten auch eine deutliche Immunität gegen Streptokokkeninfektionen erkennen ließen, untersucht, inwieweit sich bei Mäusen eine aktive Immunisierung gegen Pneumokokken durch Vorbehandlung mit Streptokokken erreichen läßt; für eine solche Möglichkeit spricht eine Beobachtung in Tab. I (Maus Nr. 13). Einige weitere Versuche bezüglich der Immunisierung durch abgetötete Streptokokken (*Aronson*), gibt Tab. V wieder.

*Tabelle V. Prüfung der Immunität gegen Strepto- bzw. Pneumokokken nach dreimaliger Vorbehandlung mit toten (virulenten) Streptokokken.*

Vorbehandlung und Prüfung i. per. Die Infektion erfolgte mit 0,000 01 ccm Serumbouillonkultur Strepto- bzw. Pneumokokken; nur in den mit * bezeichneten Fällen wurde mit der 10fach, in den mit ** bezeichneten mit der 100fach kleineren Dosis geprüft. + bedeutet: tot mit den Kontrollen; ± Tod verzögert; 0 überlebt (14 Tage). In der Zusammenfassung bedeutet 5: 2 (3) von 5 geprüften Tieren überleben 2, 3 starben verzögert an der Infektion.

| Impfstoffdosen ccm | Dauer der Vorbehandlung Tage | Zeit der Prüfung nach der letzten Impfung Tage | Infektion erfolgt mit Stamm | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Streptokokken Aronson | Streptokokken Männe | Pneumokokken Wa. (I) | Pneumokokken Am. I (I) | Pneumokokken Am. II (II) | Pneumokokken Am. III (III) |
| 1, 2, 3 | 12 | 22 | ± | + | + | + | + | · |
| 1/8, 1/4, 1/2 | 14 | 20 | ± | + | + | + | + | · |
| 1, 1, 1 | 17 | 14 | 0 | · | · | +* | · | · |
| 1, 1, 1 | 17 | 14 | · | · | · | 0** | · | · |
| 2, 2, 2 | 3 | 14 | ± | · | + | · | +* | +* |
| 2, 2, 2 | 3 | 14 | 0* | · | + | · | ±** | ±** |
| Zusammen | | | 5 : 2 (3) | 2 : 0 | 4 : 0 | 4 : 1 | 4 : 0 (1) | 2 : 0 (1) |

Diesmal wurde bei den 10 Tieren, die 20—22 Tage nach Abschluß der Vorbehandlung mit Streptokokken nachgeprüft wurden, nur ein geringer Grad von spezifischer Immunität gefunden. 2 mit 0,00001 ccm des Stammes *Aronson* geprüfte Tiere starben verzögert, je 2 mit der gleichen Dosis des Streptokokkus *Männe*, des Pneum. Wa., Am. I, Am. II und III geprüfte Mäuse starben mit den Kontrollen. Von den 14 Tage nach Abschluß der Impfung geprüften Tieren wurden 3 mit Strept. *Aronson* geprüft: 2 überlebten und das dritte starb verzögert;



8 wurden mit Pneumokokken infiziert: davon überlebte eine mit 0,0000001 Am. I geprüfte Maus, zwei andere, die mit 0,0000001 Am. II bzw. Am. III injiziert wurden, starben verzögert. Es ergab sich also nur ein ganz geringer Grad von heterologer Immunität.

Es wurde nun versucht, umgekehrt mit Pneumokokken gegen Streptokokken zu immunisieren. Hierzu wurde mehrfache Vorbehandlung mit lebenden Pneumokokken gewählt, die eine besonders kräftige Immunität zu versprechen schien. Die Versuche sind nicht tabellarisch wiedergegeben. Ähnlich wie in dem in Tab. IV mitgeteilten Versuch benutzten wir Tiere, die bei simultaner Behandlung mit Pneum. Wa. und dem zugehörigen (Pn. I) Serum überlebt hatten und injizierten dieselben zunächst 10—12 Tage danach und dann noch 2- bzw. 3 mal, zuletzt alle 3—4 Tage i. per. mit lebenden Pneum. Wa. in schnell steigender Dosis. Dabei starben 15 von 24 Tieren; es blieben 9 übrig, darunter 2, die 0,1 Pneum. Wa., 5 die 0,01 und 2, die 0,001 vertragen hatten. *Es lassen sich also Mäuse* (wenn auch unter Verlusten) *auf diese Weise verhältnismäßig schnell gegen sehr große Dosen hochvirulenter Pneumokokken immunisieren.*

Diese Tiere wurden nun 4 Tage später mit Streptokokkus *Aronson*, ebenfalls i. per., infiziert. Der hierbei benutzte Stamm war nicht von der gewöhnlich sehr hohen Virulenz: 0,0000001 tötete in 2 Tagen eine Kontrolle, die 10 mal geringere Dosis nicht. Es wurden je 2 mit 0,1 und 0,01 Pneum. Wa. vorbehandelte Mäuse mit 0,000001, also der 10 fach tödlichen Streptokokkendosis infiziert. Von diesen 4 Mäusen starb nur eine verzögert, und zwar eine mit der größeren Pneumokokkendosis vorbehandelte. Die übrigen 5 Mäuse, 3 mit 0,01 und 2 mit 0,001 Pneum. Wa. vorbehandelte Tiere, wurden mit der kleinsten noch infektiösen Dosis des Streptokokkus *Aronson* infiziert. Von diesen überlebte ein mit der größeren Dosis vorbehandeltes Tier, die übrigen starben mit der Kontrolle.

Hiernach konnten wir bei Mäusen durch Immunisierung mit Pneumokokken, wenn überhaupt, so nur eine äußerst geringe Immunität gegen Streptokokken erzielen; auch solche Tiere, die sich gegen große Dosen von Pneumokokken immun erwiesen hatten, erlagen 4 Tage danach fast sämtlich der Infektion mit kleinen, an der Grenze der Wirksamkeit stehenden Menge von Streptokokken.

Jedenfalls ist ein Übergreifen der Immunität bei aktiv mit Pneumokokken vorbehandelten Mäusen auf Streptokokken (und umgekehrt) lange nicht so deutlich nachzuweisen, wie das Übergreifen auf Pneumokokken eines anderen Typus.

Nun haben wir weiterhin versucht, ob ein Schutz gegen kleine Pneumokokkendosen nicht auch durch Vorbehandlung mit anderen Erregern, z. B. Staphylokokken, zu erreichen ist.





*Tabelle VI. Prüfung der Immunität gegen Pneumokokken nach dreimaliger Vorbehandlung mit toten Staphylokokken.*

Die Prüfung und Vorbehandlung geschieht i. per. Die Infektion erfolgt mit 1 Öse Staphylokokken bzw. 0,000 01 Pneumokokken. * und ** bedeuten, daß mit der 10 mal bzw. 100 mal geringeren Pneumokokkendosis infiziert wurde. Virulenz der Staphylokokken: $^1/_2$ Öse tötet in 24 Std., alle drei Pneumokokkenstämme töten noch in der Dosis 0,000 000 01 i. per. in 2 Tagen.

| Impfstoffdosen (Gesamtdosen) Ösen | Anzahl der Tiere | Tierverluste | Dauer der Vorbehandlung Tage | Zeit der Prüfung nach der letzten Impfung Tage | Infektion erfolgt mit | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Staphylococcus aureus | Pneumokokken Am. I | Pneumokokken Am. II | Pneumokokken Am. III |
| 1, 3, 4 | 8 | 5 | 14 | 14 | 0 | ± | · | · |
| 1, 3, 4 | · | · | · | · | · | + | · | · |
| 2, 2, 2 | 6 | 3 | 12 | 16 | 0 | · | +* | · |
| 2, 2, 2 | · | · | · | · | · | · | +** | · |
| 2, 2, 2 | 14 | 4 | 3 | 14 | 0 | · | · | ±* |
| 2, 2, 2 | · | · | · | · | · | · | · | 0** |
| 2, 2, 2 | · | · | · | · | 0 | +* | +* | +* |
| 2, 2, 2 | · | · | · | · | · | +** | +** | +** |
| | | | | Zusammen | 4 : 4 | 4 : 0 (1) | 4 : 0 | 4 : 1 (1) |

Es wurden, wie aus Tab. VI hervorgeht, 28 Mäuse mit hohen Dosen abgetöteter Staphylokokken (Agarkulturen von Staphylococcus aureus, der frisch durch eine Maus passiert war, bei 65° 1 Stunde sterilisiert) intraperitoneal immunisiert. 12 Tiere gingen dabei an der Impfung zugrunde. 14 Tage nach Beendigung der Impfung wurden von den übrigen 16 vier mit 1 Öse Staph. aureus und je 4 mit den Pneum.-Stämmen Am. I, Am. II und Am. III infiziert. Sämtliche 4 Pneumokokkenstämme töteten eine Kontrollmaus bei der Infektionsdosis 0,00000001 in 2 Tagen und wurden in der 10—100fach, gegenüber Am. I auch bei 1000fach tödlicher Dosis geprüft. Merkwürdigerweise zeigte gerade eine mit dieser hohen Dosis infizierte Maus wenigstens eine Verzögerung des Todes, während die mit der 10—100fach tödlichen Dosis, sowie die andere mit 0,00001 Am. I infizierte Maus mit den Kontrollen starben. Bei Prüfung gegen Am. II wurde keine Immunität erzielt. Aber von den mit Am. III geprüften Mäusen erwies sich eine mit 0,0000001 infizierte Maus resistent und eine mit der 10 mal höheren Dosis infizierte Maus starb verzögert an Pneumokokken. Staphylokokken gegenüber erwiesen sich alle 4 geprüften Mäuse als immun, während eine mit der gleichen und eine mit der halben Dosis infizierte Kontrolle der Infektion erlagen.

Hiernach scheint auch Vorbehandlung mit Staphylokokken, wenigstens mit sehr großen Dosen, gegenüber Pneumokokkeninfektion einen gewissen Schutz zu verleihen und es ist schwer zu entscheiden, ob man



eine unspezifische „Resistenzsteigerung“ oder eine Immunität annehmen soll. Für letztere Annahme würde sprechen, daß der Schutz noch 14 Tage nach Abschluß der Impfung nachweisbar war.

### 3. Vergleichende Versuche über aktive Immunisierung von Mäusen mit virulenten und avirulenten Pneumokokken und Streptokokken.

*Neufeld* und *Rimpau*[1]) sahen bei Kaninchen von avirulenten Pneumokokken sogar bei Anwendung von großen Dosen (auch von lebenden Kulturen) keine immunisierende Wirkung. Sie weisen darauf hin, daß ein von *Moser* mit einem völlig avirulenten Streptokokkenstamm gewonnenes Pferdeserum zwar sehr hohe Agglutinations-, aber gar keine Schutzwirkung besaß. *Neufeld* und *Rimpau* nahmen an, daß die Tropine, in denen sie die Träger der spezifischen Immunität gegen Streptokokken und Pneumokokken sehen, in enger Beziehung zu denjenigen Receptoren stehen, die die Virulenz dieser Erreger bedingen und die, wie sie nachwiesen, bei Abtötung der Erreger erhalten bleiben; sie bezeichnen sie geradezu als das Reaktionsprodukt des Organismus auf diese Receptoren[2]).

*Cecil* und *Blake*[3]) erreichten dagegen bei einem Affen durch subcutane Injektion von 2 ccm avirulenter lebender Pneumokokken eine Immunität gegen intratracheale Infektion, während ein zweites mit der halben Dosis vorbehandeltes Tier nicht geschützt war. Die Dosis bei der intratrachealen Infektion betrug dabei 0,000001. In derselben Arbeit wird über 2 Affen berichtet, die die subcutane Einspritzung von 0,001 virulenter Pneumokokken (Typ I) überstanden hatten; dieselben erwiesen sich 2—3 Wochen danach als immun gegen intratracheale Infektion mit 0,1 bzw. 0,001 derselben Kultur. Die Verfasser schließen aus diesen Versuchen, daß lebende avirulente Pneumokokken, wenn sie in genügender Menge subcutan gegeben werden, den gleichen Grad von Immunität ergeben, wie lebende virulente Kokken. Wenn auch die Versuche zu einer so weitgehenden Schlußfolgerung unseres Erachtens nicht berechtigen, so zeigen sie doch, ebenso wie unsere sogleich mitzuteilenden Mäuseversuche, daß auch hochgradig abgeschwächte Stämme noch eine gewisse Schutzwirkung haben können.

Bei weiteren Versuchen von *Cecil* und *Blake*[4]) ergab die subcutane Vorbehandlung mit *abgetöteter* avirulenter Kultur gegen intratracheale Infektion keinen Schutz, die Krankheit verlief jedoch etwas leichter,

---

[1]) Zeitschr. f. Hyg. **51**, 292 ff.

[2]) *Ornstein* (Zeitschr. f. Hyg. **96**, 70) hat neuerdings mitgeteilt, daß im Gegensatz zu Lysinen und Agglutininen *Bakteriotropine* gegen Choleravibrionen nur nach Immunisierung mit *virulenten* Stämmen auftreten.

[3]) Journ. of exp. Med. **31**, 519 und 657.

[4]) Ebenda.



insbesondere war die Infektion des Blutes geringer. Dasselbe zeigte sich auch bei 2 Affen, die intravenös (mit einer für das Kontrolltier nicht tödlichen Dosis) infiziert wurden. Der betreffende Stamm war so wenig virulent, daß selbst 1,0 ccm Mäuse nicht tötete. Es ist derselbe Stamm, den *Cecil* und *Austin* früher zu ihren Schutzimpfungen an Menschen benutzt hatten. Welche Virulenz er *damals* hatte, ist nicht ersichtlich; doch findet sich bei *Cecil* und *Blake* die Angabe, die meisten Impfstoffe würden aus avirulenten Kulturen hergestellt, weil virulente stärkere Reaktionen machten. Die Autoren bemerken dabei, die Frage, ob Pneumokokkenimpfstoffe aus virulenten Kulturen bessere Erfolge ergeben, wie solche aus avirulenten, sei vielleicht wichtiger, als gewöhnlich angenommen werde und bedürfe weiterer Untersuchung.

Da auch sonst nur wenig Tierversuche in dieser Richtung vorliegen, habe ich an einem größeren Tiermaterial über diese grundsätzlich wichtige Frage Versuche angestellt, zunächst an Mäusen, die ich mit virulenten und avirulenten Pneumokokken- und Streptokokkenstämmen vorbehandelte und auf Immunität gegen dieselben virulenten Stämme prüfte.

Die dazu benutzten Stämme waren folgende: Virulente Pneumokokken Am. I, avirulente Pneumokokken Am. I, virulente und avirulente Streptokokken (*Aronson*). Die avirulenten Pneumokokkenstämme töteten Mäuse nicht bei i. p. Injektion von 0,5 ccm (höhere Dosen wurden nicht versucht), ebenso die Streptokokken nicht bei einer Dosis von 1 ccm. Es erscheint trotzdem noch nicht ausgeschlossen, daß es dabei zu einer Vermehrung der Erreger im Organismus und zu chronischer Infektion kommen kann. Über die Herkunft der avirulenten Stämme ist in der zweiten Mitteilung berichtet worden. Zur Gewinnung des Impfstoffes wurde eine 20stündige Bouillonkultur zentrifugiert, das Sediment in physiologischer Kochsalzlösung bis zum ursprünglichen Volumen aufgeschwemmt, auf 60° während 20 Minuten erhitzt und auf Sterilität geprüft. Bei Vorbehandlung mit lebender Kultur wurde eine 20stündige Bouillonkultur benutzt. Die Vorbehandlung geschah in diesen Versuchen stets subcutan, die Infektion intraperitoneal. Die Versuche sind unter peinlich gleichen Bedingungen ausgeführt; die Ergebnisse und angewendeten Dosen sind aus Tab. VII und VIII abzulesen.

Wie aus Tab. VII und VIII zu ersehen ist, ergaben abgetötete avirulente Kulturen von Pneumokokken und Streptokokken keinen Schutz; aber auch wenn zur Immunisierung avirulente *lebende* Kulturen benutzt wurden, zeigte sich nur eine geringe Immunität gegen virulente Kulturen. Bei der Immunisierung mit avirulenten lebenden Pneumokokken wird ein vollständiger Schutz gegen eine Dosis von 0,0000001 erzeugt, gegen 0,000001 ist der Schutz unvollständig, gegen die beiden

nächstgrößeren Dosen gar nicht nachweisbar. Mit avirulenten lebenden Streptokokkenkulturen konnte nur in einem Fall von 3 ein Schutz erzielt werden gegen eine Dosis von 0,0000001 und gar kein Schutz gegen eine Dosis von 0,000001. Dagegen kann man bei Immunisierung mit gleichen Dosen abgetöteter virulenter Kulturen eine hochgradige

*Tabelle VII. Schutzimpfung von Mäusen gegen Pneum. I mit virulenter und avirulenter Kultur.*

Kontrollen mit 0,000 000 1 und 0,000 000 01 starben in 2 Tagen.

| Impfstoff Dosen subcutan ccm | Dauer der Vorbehandlung Tage | Zeit der Prüfung nach der letzten Impfung Tage | Prüfung mit Am. I i. per. | Erfolg bei Immunisierung mit: Pneum. Am. I, und zwar: a toter virulenter Kultur | b toter avirulenter Kultur | c lebender avirulenter Kultur |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1/8, 1/4, 1/2 | 14 | 14 | 0,0001 | +<br>0 | +<br>+ | +<br>+ |
| 1/8, 1/4, 1/2 | 14 | 14 | 0,00001 | 0<br>0 | +<br>+ | +<br>+ |
| 1/8, 1/4, 1/2 | 14 | 14 | 0,000001 | 0<br>0 | +<br>+ | ±<br>0 |
| 1/8, 1/4, 1/2 | 14 | 14 | 0,0000001 | 0<br>0 | +<br>+ | 0<br>0 |
| | | | Zusammen | 8 : 7 | 8 : 0 | 8 : 3 (1) |

*Tabelle VIII. Schutzimpfung von Mäusen gegen Streptokokkus Aronson durch Vorbehandlung mit virulenter und avirulenter Kultur.*

Kontrollen starben in 2 Tagen durch 0,0000001 und 0,00000001.

| Impfstoff Dosen subcutan ccm | Dauer der Vorbehandlung Tage | Zeit der Prüfung nach der letzten Impfung Tage | Prüfung mit Streptok. Aronson (A) i. per. Kulturmenge | Erfolg bei Immunisierung mit Streptokokkus Aronson, und zwar a toter virulenter Kultur | b toter avirulenter Kultur | c lebender avirulenter Kultur |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1, 1, 1 | 3 | 14 | 0,00001 | +<br>0 | . | . |
| 1, 1, 1 | 3 | 14 | 0,000001 | 0<br>0<br>. | +<br>+<br>+ | +<br>+<br>+ |
| 1, 1, 1 | 3 | 14 | 0,0000001 | 0<br>0<br>. | +<br>+<br>+ | +<br>+<br>0 |
| | | | Zusammen | 6 : 5 | 6 : 0 | 6 : 1 |

+ = Maus stirbt.
± = Maus stirbt verzögert.
0 = Maus überlebt.
8 : 3 (1) bedeutet: Von 8 Tieren 3 gerettet, 1 verzögert gestorben.

Immunität erreichen. So wird bei Pneumokokken gegen Dosen bis zu 0,00001 eine vollständige und bei 0,0001 eine unvollständige Immunität erzielt, ebenso bei Streptokokken gegen Dosen bis 0,000001 eine vollständige und gegen 0,00001 unvollständige Immunität. *Zu Schutzimpfungen gegen Pneumokokken und Streptokokken sollte man hiernach ausschließlich möglichst hochvirulente Stämme anwenden.*

Dasselbe gilt für die Serumgewinnung; in Immunsera von Kaninchen, die durch Impfung mit avirulenten Pneumokokken und Streptokokken erhalten waren, konnte ich keine Schutzstoffe nachweisen (siehe die später folgende Mitteilung IV).

Ich glaube, daß ähnliche Bedingungen auch für andere Bakterienarten gelten. Zum mindesten sprechen zahlreiche Beobachtungen dafür, daß bei einer Abschwächung über einen gewissen Grad hinaus viele Krankheitserreger ihre immunisierende Wirkung vollständig einbüßen und man darf wohl vermuten, daß die immunisierende Kraft annähernd, wenn auch vielleicht nicht völlig parallel mit dem Verlust der Virulenz schwindet.

### 4. Vergleichende Versuche an Mäusen über den Einfluß der Dosierung des Pneumokokken-Schutzimpfstoffes.

Bei der aktiven Immunisierung von Mäusen habe ich, wie ich in meiner ersten Mitteilung anführte, folgende 3 Verfahren angewendet: 1. 3 Injektionen während 2 Wochen (also jeden 7. Tag eine Injektion); 2. es wurde 3 Tage lang täglich 1 mal oder 3. an einem Tage 6 mal in $^1/_2$stündlichen Intervallen geimpft. Bei einem Versuch habe ich außerdem noch eine vierte Methode angewendet, nämlich nur eine 1 malige Injektion gegeben. Der Impfstoff wurde nach der gleichen Methode hergestellt, wie ich in der ersten Mitteilung berichtet habe. Für alle Impfungen wurde ein und derselbe Impfstoff benutzt. Die gesamte verabfolgte Dosis war immer die gleiche, nämlich die aus 3 ccm Bouillonkultur ausgeschleuderten Kokken. Die Mäuse waren möglichst gleich schwer (20—25 g). Die Impfungen sind so ausgeführt worden, daß bei allen angewendeten Methoden die Tiere die letzte Impfung an ein und demselben Tage erhielten. Die Prüfung geschah, ebenso wie die Vorbehandlung, intraperitoneal, und zwar 14 Tage nach der letzten Impfung; dabei wurden, um den Einfluß der Virulenzschwankungen auszuschalten, alle Tiere gleichzeitig aus demselben Kulturröhrchen infiziert.

Zur Vorbehandlung wurden abgetötete Kulturen unseres virulentesten Pneumokokkus vom Typ. I (*Wachholz*) benutzt. Die bei den einzelnen Impfungen benutzten Dosen sind aus Tab. IX zu ersehen.



*Tabelle IX. Aktive Immunisierung von Mäusen mit Pneum. I (Pneum. Wa.).*

**Variierung des Intervalles und der Zahl und Größe der Einzeldosen bei gleicher Gesamtmenge (3 ccm). Impfung und Prüfung erfolgen i. per. Kontrollen starben in 2 Tagen durch 0,0000001 und 0,00000001.**

| Zahl der Impfungen und Intervalle | Impfstoffdosen (Größe der Einzeldosen) | Dauer der Vorbehandlung | Zeit der Prüfung nach der Impfung | Prüfung mit Pn. Wa. Kulturmengen | | | Zusammen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | 0,0001 | 0,00001 | 0,000 001 | |
| Jede Woche 1 mal | 1, 1, 1 ccm | 15 Tage | 14 Tage | + | + | + | 12 : 5 |
| | | | | + | + | 0 | |
| | | | | + | 0 | 0 | |
| | | | | + | 0 | 0 | |
| 3 Tage täglich 1 mal | 1, 1, 1 „ | 3 „ | 14 „ | + | + | 0 | 12 : 8 |
| | | | | + | + | 0 | |
| | | | | 0 | 0 | 0 | |
| | | | | 0 | 0 | 0 | |
| 1 Tag 6 mal ½ stündlich | jedesmal 0,5 ccm | 1 „ | 14 „ | + | + | 0 | 12 : 9 (1) |
| | | | | + | 0 | 0 | |
| | | | | 0 | 0 | 0 | |
| | | | | 0 | 0 | 0 | |
| 1 Tag 1 mal | 3 ccm | 1 „ | 14 „ | + | + | + | 12 : 3 (1) |
| | | | | + | + | + | |
| | | | | + | + | 0 | |
| | | | | + | 0 | 0 | |

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, kann man die dritte Methode als die beste ansehen, bei der an einem Tage 6 mal in ½ stündlichen Intervallen geimpft wurde. Bei der ersten Methode (alle 7 Tage eine Injektion) sind gegen die kleinste Infektionsdosis von 4 Tieren 3 geschützt, gegen die mittlere Dosis 2, und gegen die größte keins. Bei der zweiten Methode sehen wir vollständigen Schutz gegen die kleinste Dosis (0,000001) und Rettung von je 2 von 4 Tieren bei der mittleren und größten Dosis (0,00001 und 0,0001). Die dritte Methode ergab gegen die kleinste Dosis vollständigen Schutz, gegen die mittlere Dosis bei 3 von 4 Tieren Schutz und bei dem vierten verzögerten Tod, gegen die größte Dosis Schutz bei 2 von 4 Tieren. Die vierte Methode zeigt die schlechtesten Resultate: Schutz bei 2 von 4 Tieren gegen eine Dosis von 0,000001, 1 von 4 Tieren bei einer Dosis von 0,00001, kein Schutz gegen eine Dosis von 0,0001.

In demselben Sinne spricht die Tab. X. Hier wurden Mäuse nach den ersten 3 Methoden immunisiert und gegen den zur Vorbehandlung benutzten sowie gegen einen anderen homologen Stamm geprüft.





*Tabelle X. Immunisierung mit Pneum. Wa. wie in Tab.* IX *mit verschiedener Verteilung der Einzeldosen.*

Prüfung mit Pneum. Wa. und Am. I. Beide Stämme töten in Dosen von 0,000 000 1 und 0,000 000 01 Mäuse in 2 Tagen.

| Immunisierungs-methode | Impfstoff-dosen (Größe der Einzeldosen) | Dauer der Vor-behand-lung | Zeit der Prüfung nach der letzten Impfung | Kulturmenge bei Prüfung mit Pn. Wachholz 0,0001 | Pn. Wachholz 0,00001 | Pn. Wachholz 0,000001 | Pn. Am. I. 0,0001 | Pn. Am. I. 0,00001 | Pn. Am. I. 0,000001 | Zusammen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Jede Woche | 1, 1, 1 cm | 15 Tage | 14 Tage | + | 0 | 0 | + | + | 0 | 12:7 |
| 1 mal | | | | + | 0 | 0 | + | 0 | 0 | |
| 3 Tage täglich | 1, 1, 1 „ | 3 „ | 14 „ | + | 0 | ± | 0 | + | 0 | 12:8(1) |
| 1 mal | | | | + | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 1 Tag 6 mal | jedesmal | 1 „ | 14 „ | 0 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | 12:10 |
| 1/2 stündlich | 0,5 cm | | | 0 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | |

Der Schutz gegen den eigenen Stamm war durchschnittlich etwas besser als gegen den anderen homologen Stamm, obwohl der letztere (Am. I) weniger virulent war. Im übrigen hat auch hier die dritte Methode die besten Resultate ergeben, demnächst die zweite.

Während in den soeben beschriebenen Versuchen die Gesamtmenge des Impfstoffs stets die gleiche, nämlich die aus 3 ccm Bouillonkultur ausgeschleuderten Kokken war, habe ich in dem folgenden Versuch die Gesamtmenge zwischen 0,03 und 30 ccm abgestuft, die Mengen aber immer in derselben Weise auf 6 Einzeldosen verteilt, die an einem Tage in etwa 1/2 stündigen Zwischenräumen gegeben wurden, also entsprechend der dritten Methode in den vorigen Versuchen.

Mit jeder Dosis wurden 6 Mäuse intraperitoneal vorbehandelt, 14 Tage danach ebenfalls intraperitoneal infiziert, und zwar je 2 Tiere mit 0,0001—0,00001—0,000001 Bouillonkultur des zur Vorbehandlung benutzten Stammes (s. Tab. XI). Von den mit der größten Impfdosis injizierten Tieren starben 2 infolge der Vorbehandlung.

*Tabelle XI. Vergleich der Immunisierung mit verschiedenen Mengen abgetöteter Pneumokokken.*

Vorbehandlung und Infektion intraperitoneal.

| Gesamtmenge des Impfstoffes | Impfung 6 mal in 1/2 stündigen Zwischenräum. | Infektion 14 Tage nach der Impfung mit Pneum. Wachholz 0,0001 | Pneum. Wachholz 0,00001 | Pneum. Wachholz 0,000001 | Zusammen |
|---|---|---|---|---|---|
| 0,03 ccm | 6 mal | lebt | lebt | lebt | 6 : 6 |
| | 0,005 ccm | „ | „ | „ | |
| 0,3 „ | 6 mal | „ | „ | „ | 6 : 6 |
| | 0,05 ccm | „ | „ | „ | |
| 3,0 „ | 6 mal | „ | „ | „ | 6 : 4 |
| | 0,5 ccm | „ | Tod | Tod | |
| 30,0 „ | 6 mal | Tod | „ | . | 4 : 0 (2) |
| | 5,0 ccm | Tod (verzög.) | (Tod verzög.) | . | |

Das Ergebnis ist insofern eindeutig, als die größte Dosis (30 ccm) am schlechtesten wirkte: Hier starben alle Tiere. Auch die nächstkleinere Impfdosis (3 ccm) ist noch zu groß; hier starben 2 von 6 Tieren, während bei einer Gesamtdosis von 0,3 und 0,03 ccm alle Mäuse am Leben blieben.

Wahrscheinlich sind die ungünstigen Resultate von *Raphael*[1]), wonach die Immunisierung an Mäusen gegen Pneumokokken sehr schwierig, beinahe unmöglich sein soll, durch Verwendung zu großer Dosen zu erklären.

Die Versuche bedürfen einer Vervollständigung nach 2 Richtungen. Einmal ist die Grenze nach unten hin nicht erreicht, die kleinste, voll wirksame Dosis nicht festgestellt. Andererseits erscheint es aber auch wünschenswert, ebenso vorbehandelte Tiere nach längeren Intervallen zu prüfen, um die Dauer der Immunität festzustellen und insbesondere zu untersuchen, ob auch bei Nachprüfung nach längerer Zeit die mit kleinen Dosen geimpften Tiere sich günstiger verhalten als die mit großen Dosen behandelten.

*Cecil* und *Austin*[2]) haben Schutzimpfungen bei Menschen ausgeführt, dabei haben sie verschiedene Methoden angewendet, doch war die Gesamtmenge immer die gleiche. Eine Gruppe wurde mit einer 1 maligen großen Dosis behandelt, eine andere Gruppe mit 3 und 4 mäßigen Dosen mit 3—7tägigen Intervallen, bei einer dritten Gruppe wurden täglich während 7 Tagen sehr kleine Dosen verwendet. Die Sera der geimpften Personen wurden auf Agglutination und Schutzwirkung bei Mäusen geprüft. Nach diesen Versuchen soll die Schutzwirkung und Agglutination von der Gesamtmenge aber nicht von der Zahl der Dosen abhängig sein. Kleine tägliche Dosen gaben überhaupt kaum eine Nebenwirkung, 1 malige große dagegen schwere lokale und allgemeine Nebenerscheinungen. Bei meinen Versuchen an Mäusen, wo die Gesamtmenge die gleiche, die Verteilung derselben auf die Einzeldosen aber verschieden war, zeigt die Schutzwirkung deutliche Unterschiede. Ich nehme daher an, daß die Schutzwirkung auch von der Verteilung der Dosen beeinflußt wird. Man darf sich vielleicht vorstellen, daß kleine Impfdosen dann besonders günstig wirken, wenn sich die antikörperbildenden Zellen infolge einer vorhergegangenen Einspritzung bereits im Zustande einer gewissen Reizung befinden. Bisher ist man bei Schutzimpfungen in der Regel von dem umgekehrten Gesichtspunkt ausgegangen, nämlich den durch die erste Einspritzung gesetzten Reiz erst abklingen zu lassen, bevor man die nächste Dosis

[1]) Annales Pasteur, 1920; vgl. auch *Cotoni*, *Truche* und *Raphael*, Pneumocoques et affections pneumococciques. Monographie de l'Institut Pasteur 1922, S. 67.

[2]) Journ. of exp. med. **28**, 19.



gab. Ich halte es für wahrscheinlich, daß man mit der von mir als besonders wirksam erprobten Methode der mehrmaligen (z. B. 6 maligen) Einspritzung im Laufe eines Tages auch bei Impfungen am Menschen gute Resultate erzielen kann. Natürlich müßten die Einzelheiten eines derartigen Verfahrens zunächst am Menschen sorgfältig ausprobiert werden; es erscheint mir aber in jedem Fall lohnend, solche Versuche zu machen. Ein solches Verfahren kann auch einen praktischen Vorteil haben besonders dann, wenn die Impfungen rasch ausgeführt werden müssen, wie bei plötzlichen Seuchenausbrüchen, bei denen man schnell vorgehen muß. Ich habe mit dieser Methode nur Experimente mit Pneumokokken angestellt, doch glaube ich, daß damit vielleicht auch bei Impfungen mit anderen Bakterienarten noch bessere Erfolge erzielt werden können als bisher, wo 2 oder 3 Impfungen meistens mit 5—7 tägigen Intervallen ausgeführt werden; jedenfalls erscheint es geboten, ähnliche Versuche auch mit anderen Erregern zu machen. Aber die Frage der Anwendung einer solchen Schnellmethode ist natürlich auch abhängig von den Nebenerscheinungen, die die Impfung etwa hervorruft und muß schon aus diesem Grunde für jeden Fall besonders geprüft werden.

## Versuche zur aktiven Immunisierung von Meerschweinchen.

Anhangsweise sollen im folgenden noch unsere Versuche an Meerschweinchen und Kaninchen mitgeteilt werden, obwohl sie weniger deutliche Ausschläge ergeben haben als die an Mäusen.

Zur Immunisierung der Meerschweinchen wurden Pneumokokken vom Typ. I (Am. I) benutzt. Sie waren für Mäuse hochvirulent, ihre Virulenz für Meerschweinchen war dagegen gering. Bei der ersten Tierpassage wurden 0,5 ccm Bouillonkultur intraperitoneal injiziert, was den Tod nach 3 Tagen herbeiführte. Die Meerschweinchen waren in 2 Gruppen geteilt; eine Gruppe wurde mit abgetöteten, die andere zuerst mit abgetöteten und dann mit lebenden Kulturen immunisiert. Die Herstellung der abgetöteten Kulturen war die gleiche wie bei den vorherigen Versuchen. Die lebenden Kulturen wurden als Bouillonkulturen verabfolgt. Die Vorbehandlung erfolgte bei beiden Gruppen subcutan in 7 tägigen Intervallen und mit steigenden Dosen. Die Prüfung wurde intraperitoneal vorgenommen, dabei wurden die Stämme Am. I und Am. II verwendet, nachdem sie eine mehrmalige Passage durch Meerschweinchen durchgemacht hatten. Am Tage der Prüfung wurde von jedem Tier Serum entnommen und auf Agglutination und Schutzwert an Mäusen ausgewertet, wobei eine mittlere Infektionsdosis (0,00001 ccm Am. I) zur Anwendung kam.

Es ergab sich ein vollständiger Schutz gegen die etwa 10fach tödliche Menge des homologen Typus sowohl bei Vorbehandlung nur mit ab-



getöteten als auch mit abgetöteten und lebenden Kulturen, dagegen bei gleicher Vorbehandlung kein deutlicher Schutz gegen den heterologen Typ. II. Bei beiden Gruppen trat bei je einem Meerschweinchen eine Verzögerung im Vergleich zu den Kontrolltieren ein, bei zweien erfolgte der Tod gleichzeitig mit den Kontrolltieren. Es ist aber hervorzuheben, daß die zur *Immunisierung* benutzten lebenden Pneum. Am. I nur eine sehr geringe Virulenz für Meerschweinchen besaßen. Die Kultur mußte mehrere Meerschweinchenpassagen durchmachen, ehe sie die Tiere überhaupt mit Sicherheit tötete, sie starben auch bei Einspritzung von 0,5 ccm gewöhnlich erst nach 3 Tagen und später. Der zur *Nachprüfung* benutzte Stamm Am. I war etwas virulenter: 0,01 ccm tötete in 4 Tagen eine Kontrolle, 0,001 in 11 Tagen, 0,002 ließ aber ein Tier am Leben.

Im einzelnen verlief der Versuch folgendermaßen:

1. Gruppe. 5 Meerschweinchen erhielten 6 mal tote (1, 2, 4, 6, 8, 10 ccm) Am. I. Ihr Serum agglutiniert 0; schützt 0,1—5 : 3 (2); 0,01—5 : 0 (1).

2 mit 0,01 bzw. 0,02 Am. I nachgeprüfte Tiere überleben, 3 mit Am. II geprüfte starben, eins davon verzögert.

2. Gruppe. 5 Meerschweinchen erhielten 3 mal tote (1—4 ccm), 4 mal lebende Am. I. Ihr Serum agglutiniert 0; schützt 0,1—5 : 4; 0,01—5 : 1 (1). Auch hier überleben die beiden mit Am. I geprüften Meerschweinchen, die 3 mit Am. II infizierten sterben, eins davon verzögert.

0,1—5 : 3 (2) bedeutet: 0,1 Serum schützt 3 mal und verzögert 2 mal den Tod, wobei von jedem Meerschweinchen eine Serumprobe an je einer Maus versucht wurde.

Es zeigt sich bei dieser Prüfung, daß ein Tier selbst gegen die Infektion geschützt blieb, während sein Serum keine Schutzstoffe enthielt. Wichtig ist, daß die Agglutination unabhängig von dem Schutzwert des Serums ist, also hierfür nicht als Wertmesser verwendet werden darf.

Die 4 Meerschweinchen, die aus beiden Gruppen des vorigen Versuches die i. per. Impfung mit 0,02—0,01 der virulenteren Pneumokokken Am. I überstanden hatten, wurden 12 Tage darauf mit 0,002 der letzten Meerschweinchenpassage des Pneumokokkus Am. II infiziert, der noch etwas virulenter war (Kontrolle 0,001 $+_4$). Von diesen Tieren überlebte eins, 1 starb verzögert.

In diesen Versuchen am Meerschweinchen ließ sich also höchstens ein sehr geringer Schutz gegen heterologe Typen feststellen.

Es ist zu berücksichtigen, daß hier im Gegensatz zu den Mäuseversuchen auch gegen den eigenen Typus eine Immunität nur gegen 0,02 ccm festgestellt wurde, eine Dosis, von der der 10. Teil die Kontrolle erst in 12 Tagen tötete. Der schlechte Erfolg beruht vielleicht zum Teil darauf, daß zur Immunisierung schlecht virulente Kulturen benutzt wurden. Es ist möglich, daß auch sonst die Vorbehandlung



der Meerschweinchen unzweckmäßig, daß insbesondere die Dosen zu groß waren; vielleicht lassen sich diese für Pneumokokken weniger empfänglichen Tiere überhaupt nicht so gut immunisieren wie Mäuse.

### Versuche zur aktiven Immunisierung von Kaninchen.

Zur Immunisierung von Kaninchen habe ich folgende Stämme benutzt: *Wachholz* (Typ. I) und Am. I und Am. II (Typ. II). Diese Stämme waren für Mäuse hochvirulent, für Kaninchen habe ich ihre Virulenz zunächst nicht genauer festgestellt; 0,01 des mäusevirulenten Pneum. Wa. (Typ. I) war jedoch tödlich, während dieselbe Dosis bei dem Stamm Ra. (Typ. II) erst nach mehrfachen Passagen die Tiere tötete. Die Kaninchen, die zunächst zur Serumgewinnung dienten, wurden in 2 Gruppen geteilt, wovon die eine mit Stamm *Wachholz*, die andere mit Stamm Am. II vorbehandelt wurde. Die erste Gruppe (5 Tiere) wurde zuerst mit abgetöteten, zuletzt mit lebenden Kulturen immunisiert, bei der anderen Gruppe wurde ein Kaninchen zuerst mit abgetöteten, dann mit lebenden und 2 Kaninchen nur mit lebenden Kulturen vorbehandelt. Die lebenden Kulturen werden subcutan, die abgetöteten intravenös verabfolgt; dazu wurden Kulturen benutzt, die (im Gegensatz zu den bei der Vorbehandlung benutzten) durch einige Kaninchenpassagen virulenter geworden waren.

In Tab. XII sind alle Tiere zunächst mit abgetöteten Pneum. Wa. zum Teil mit großen Mengen behandelt worden; sie besaßen auch, wie die erste Serumprüfung zeigt, mit Ausnahme eines Tieres einen ziemlich hohen Serumtiter. Die Tiere wurden nunmehr, wie aus der Tabelle zu ersehen, in verschiedener Weise mit steigenden Mengen lebender Kultur behandelt; im ganzen haben dabei Kan. 294 0,02; Kan. 988 0,3; die 3 übrigen 0,2 ccm lebender Pneum. Wa. erhalten. 16 Tage nach Abschluß der Behandlung zeigten 3 Kaninchen einen vollständigen Schutz gegen Infektion mit der 1000fach tödlichen Dosis virulenten Kaninchenpassagestammes vom Typ. I (*Wachholz*).

Auch die Infektion mit 0,01 ccm des heterologen Typ. II überstehen 2 Tiere, aber dieser Stamm ist für Kaninchen nur schwach virulent; dieselbe Dosis tötet das Kontrolltier erst in 10 Tagen und eine 10fach kleinere Dosis ist unwirksam. Was die serologischen Befunde betrifft, so enthielt das Blutserum der beiden letzten Kaninchen im Schutzversuch an Mäusen reichlich Schutzkörper gegen Pneum. Wa.; dagegen waren keine Schutzkörper gegen Pneum. Ra. nachzuweisen (0,1 Serum schützte nicht gegen 0,0000001 Kultur!). Offenbar ist aber für die aktive Immunität die Anwesenheit von Schutzkörpern im Blut nicht erforderlich. Das geht wohl auch daraus hervor, daß die Tiere 28 und 29 keine Schutzkörper im Blut hatten, obgleich sie sich gegen 0,01 Wa. geschützt erwiesen. Auffallend ist es, daß bei diesen Tieren anscheinend



*Tabelle XII. Immunisierung von Kaninchen mit Pneum. Wa. (Typ. I) und Prüfung der Immunität durch Blutuntersuchung nach 14 Tagen, nach weiteren 2 Tagen durch Infektion zum Teil mit homologen, zum Teil mit heterologen Pneum.*

| Nr. d. Tieres | Vorbehandlung mit toten Pn. Wa. | Serumuntersuchung | | Vorbehandlung mit lebenden Pn. Wa. | | | Prüfung des Serums | | Infektion mit | Erfolg |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Aggl. | Schutzwert | Beginn | Dauer | Dosierung | Aggl. | Schutzwert | | |
| 988 | Steigende, größere Dosen ges. Menge 398 ccm | 1 : 100 | 0,003 | Nach 2 Mon. | $4^1/_2$ Mon. | 0,00001—0,3 (in 12 Injekt.) | 1 : 100 + | 0,001 | 0,01 Ra. (Typ. II) | lebt |
| 26 | Kleine gleiche Dosen ges. Menge 18 ccm | 1 : 100 ± | 0,00001 ± | „ 5 Tg. | 3 Woch. | 0,1 und 0,2 (2 Injekt.) | 1 : 50 | 0,0001 | 0,01 Ra. (Typ. II) | „ |
| 28 | Kleine gleiche Dosen ges. Menge 54 ccm | 1 : 100 ± | 0,001 | „ 5 „ | 3 „ | dgl. | 1 : 100 | <0,01 | 0,01 Wa. (Typ. I) | „ |
| 29 | Kleine gleiche Dosen ges. Menge 54 ccm | 1 : 100 | 0,00001 | „ 5 „ | 3 „ | dgl. | 1 : 50 ± | <0,01 | 0,01 Wa. (Typ. I) | „ |
| 294 | Kleine steigende Dosen ges. Menge 6,3 ccm | 1 : 2 ± | <0,03 | „ 0 „ | 2 Mon. | 0,0001—0,02 (5 Injekt.) | 1 : 100 | 0,01 | 0,001 Wa. (Typ. I) | „ |

Kontrollen: 0,001 Pneum. Wa. $+_2$; 0,000 01 $+_6$; Pneum. Ra. 0,01 $+_{10}$, 0,001 lebt.

*Tabelle XIII. Immunisierung von Kaninchen mit Pneum. Ra. (Typ. II) und Prüfung der Immunität durch Blutentnahme nach 14 Tagen, nach weiteren 2 Tagen durch Infektion mit dem gleichen Stamm, 8 Tage später mit dem heterologen (Typ. I).*

| Nr. d. Tieres | Vorbehandlung mit toten Pn. II (Am. II) | Vorbehandlung mit lebenden P. II (Ra.) | | | Prüfung des Serums | | Infektion mit: | | Erfolg |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Beginn | Dauer | Dosierung | Aggl. | Schutzwert | Ra. (Typ. II) | u. 8 Tage später Wa. (Typ. I) | |
| 19 | 4 Tage mit im ganzen 24 ccm | Nach 5 Tagen | 2 Monate | 0,0001—0,02 (5 Injekt.) | 1 : 25 ± | 0,01 ± | 0,01 | 0,00001 | lebt |
| 64 | dgl. | „ 5 „ | 3 Wochen | 0,001—0,02 (3 Injekt.) | 1 : 10 | <0,1 | 0,01 | 0,00001 | $+_4$ |
| 75 | dgl. | „ 5 „ | 13 Tage | 0,01—0,02 (2 Injekt.) | 1 : 25 ± | 0,01 ± | 0,01 | 0,00001 | lebt |

Kontrollen: 0,00001 Pneum. Wa. $+_3$; 0,000001 $+_3$; die Infektion mit Pneum. Ra. gleichzeitig mit d. Versuch in Tab. XII ausgeführt.

durch die Behandlung mit lebender Kultur ein Schwinden der Schutzkörper stattfand. Überhaupt ist nur bei Kan. 988 und 294, die monatelang mit lebender Kultur behandelt wurden, der Titer in bescheidenem Maße angestiegen, während das Sinken der Schutzkraft in den beiden genannten Fällen sehr bedeutend war. Der Gehalt an Agglutininen blieb dagegen ziemlich unverändert, bei Kan. 294 stieg er von 1 : 2 auf 1 : 100. Auch dieses Tier ist sehr lange vorbehandelt worden. In der nächsten Arbeit komme ich auf die serologischen Veränderungen näher zurück.

Für die Tatsache, daß die aktive Immunität nach Immunisierung von Kaninchen mit (lebenden) Pneumokokken auf einen anderen Typ übergreift, ist der andere Versuch (Tab. XIII) beweisender, da hier die Infektion mit der hochvirulenten Kaninchenpassagekultur des Pneum. Wa. ausgeführt wurde. Wie Tab. XIII zeigt, sind die Kaninchen sehr verschieden lange Zeit mit (mäusevirulenten) lebenden Pneumokokken des Typ. II (Ra.) vorbehandelt worden und erhielten zuletzt alle die Dosis 0,02. Ihr Serum wurde nach 14 Tagen geprüft, enthielt aber sehr wenig Antikörper gegen den Typ. II, auch die Agglutination war recht unbedeutend. 2 Tage darauf überlebten jedoch sämtliche Tiere die Infektion mit der Kaninchenpassage des Stammes Ra. Nach weiteren 8 Tagen wurden sie mit der mindestens 10fach tödlichen Dosis des heterologen hochvirulenten Pneum. Wa. (Kaninchenpassage) infiziert; 2 Tiere überstanden die Infektion.

Die Versuche an Kaninchen leiden daran, daß uns vom Typ. II kein für diese Tierart gut virulenter Stamm zur Verfügung stand (Am. II war noch weniger virulent). Immerhin zeigen sie, daß auch bei dieser Tierart die aktive Immunität auf einen fremden Typus übergreift.

## Schlußsätze.

1. Es wurde durch weitere Versuche bestätigt, daß Mäuse durch Vorbehandlung mit abgetöteten Pneumokokken eines Typus auch eine nicht unbeträchtliche Immunität gegen heterologe Typen erwerben.

2. Mäuse, die lebende Pneumokokken eines Typus intraperitoneal vertragen haben, waren 3—4 Tage später gegen ebenfalls intraperitoneale Injektion heterologer Pneumokokken geschützt; dieser Schutz ist quantitativ stärker als bei Vorbehandlung nur mit abgetöteten Pneumokokken, scheint aber schnell abzuklingen.

3. Ein Schutz gegen Streptokokken durch Vorbehandlung mit Pneum. und umgekehrt ließ sich, wenn überhaupt, nur in ganz geringem Maße nachweisen. Auch Vorbehandlung mit sehr großen Dosen abgetöteter Staphylokokken ergab einen gewissen Schutz gegen Pneumokokkeninfektion bei Nachprüfung nach 14 Tagen.





4. Vorbehandlung mit abgetöteten avirulenten Pneumo- und Streptokokken ergab keinen merklichen Schutz, Vorbehandlung mit lebenden avirulenten viel schlechteren als mit toten virulenten. Da das wahrscheinlich auch für manche andere Erreger zutrifft, so sollte bei allen Schutzimpfungen die Virulenz mehr als bisher berücksichtigt werden.

5. Bei Immunisierung von Mäusen mit toten Pneum. ist der Erfolg in hohem Maße abhängig von der Gesamtmenge, aber auch von der Verteilung der Einzeldosen; bereits sehr kleine Mengen (0,03 ccm im ganzen) ergeben guten Schutz, zu große Mengen wirken viel schlechter. Eine besonders gute Wirkung ergab 6 malige Injektion mit kleinen Dosen alle $^1/_2$ Stunden. Sollte sich das auch bei anderen Tierarten und anderen Erregern bestätigen, so käme eine ähnliche Methode auch für Schutzimpfungen am Menschen in Frage.

6. Auch bei Meerschweinchen und Kaninchen wurde in gewissem Grade ein Übergreifen der Immunität auf andere Typen festgestellt. Die Ergebnisse waren jedoch schlechter als bei Mäusen, zum Teil wohl wegen der geringen Virulenz der Erreger für diese Tierarten.





(Aus dem Institut „Robert Koch“ [Abteilungsleiter: Dr. *O. Schiemann*].)

# Beiträge zur Pneumokokkenimmunität.

## IV. Mitteilung.

## Über die Gewinnung von Antipneumo- und Antistreptokokkenserum von Kaninchen.

Von

Prof. Dr. **Masaaki Yoshioka,** Tokio.

Seitdem *Cole* und seine Mitarbeiter den Versuch einer Serumtherapie der Pneumonie in großem Maßstabe wieder aufgenommen haben, hat die Frage, auf welche Weise man am besten hochwertige Antisera gegen Pneumokokken gewinnt, erneutes Interesse gewonnen. Die folgenden Untersuchungen, die sich ausschließlich auf Kaninchen beziehen, sollen einen Beitrag zu dieser Frage liefern; sie erstrecken sich z. T. auch auf Streptokokken.

*Neufeld* und *Haendel*[1]) empfehlen auf Grund früherer Versuche von *A. Fränkel, Emmerich, Mennes* usw. und ihrer eigenen Erfahrungen an Kaninchen und Pferden 1. ausschließliche Verwendung hochvirulenter Stämme; 2. bei größeren Dosen Benutzung nur des Bodensatzes von flüssigen Kulturen (in Bouillon oder Serumbouillon) nach Zentrifugieren; 3. nur *eine* intravenöse Einspritzung einer großen Dosis durch Hitze abgetöteter Kokken zur Erzeugung einer „Grundimmunität“, dann lebende Kultur, gleichfalls intravenös in schnell steigender Menge, zuerst in kleinen, dann in größeren Abständen. Dabei erhielten sie Sera, die im Mäuseversuch bei intraperitonealer Einspritzung in Mengen bis 0,003 herab gegen Pneum. I, bis 0,02 herab gegen Pneum. „Franz“ (identisch mit dem amerikanischen Typus II) gegen eine 3 Stunden danach erfolgende ebenfalls intraperitoneale Infektion mit mittleren Mengen (0,01 bis 0,0001 Bouillonkultur) höchstvirulenter Kultur schützten. *Neufeld* und *Haendel* haben allerdings, wie ich hier mitteilen darf, bei Fortsetzung ihrer Versuche an im ganzen 12 Pferden in den Jahren 1912—14 ihre Immunisierungsmethode mehrfach variiert, indem sie Pferde nicht nur mit steigenden Mengen lebender Kokken aus zentrifugierter Bouillonkultur (bis 650 ccm Einzeldosis), sondern auch teils mit nicht zentrifugierter *Voll*kultur (bis 350 ccm), teils ausschließlich mit abgetöteter zentrifugierter Kultur (bis 500 ccm) behandelten. Auch letztere Methode ergab ganz hochwertige Sera.

[1]) *Kolle-Wassermann*, Handbuch, 2. Aufl., IV, S. 535—552, S. 571 ff.

*Cole* und *Moore*[1]) haben in eingehenden Versuchen gezeigt, daß man bei Kaninchen trotz erheblicher individueller Unterschiede durch intravenöse Behandlung mit abgetöteten Pneumokokken vom Typus I bei geeigneter Dosierung regelmäßig gute Schutzsera erhält. Sie benutzten stets den durch Zentrifugieren von Bouillonkulturen (ohne Serum- oder Zuckerzusatz) mäusevirulenter Pneumokokken gewonnenen Bodensatz, der durch $^3/_4$stündiges Erhitzen auf 56° sterilisiert wurde. Die abgetöteten, wieder in Kochsalzlösung aufgeschwemmten Kokken konnten dabei mindestens 8 Tage lang im Eisschrank aufgehoben werden. 5 malige Einspritzung von je 250 ccm (d. h. dem Bodensatz davon) in 7 tägigen Abständen ergab stets sehr schlechtes Serum, ebenso die 14 Tage lang fortgesetzte tägliche Einspritzung mit gleichbleibender kleiner Dosis, ferner einige Versuche mit Simultaneinspritzung lebender Kokken plus Immunserum. Abtötung der Kokken durch Carbolzusatz, Gefrierenlassen und danach Verreiben, Auflösung durch Galle lieferte kein besseres Antigen als Hitzeabtötung. Sehr gutes Serum, das in der Dosis von 0,2 mit 0,1 ccm hochvirulenter Kultur gemischt und i. per. injiziert, Mäuse schützte, erhielten die Autoren, wenn sie 7 Tage hintereinander täglich 1 (oder 2) ccm injizierten und diese Serie von Einspritzungen noch 2 mal nach Pausen von einer Woche wiederholten.

Bei ihren Versuchen an Pferden, auf die wir hier nicht näher eingehen wollen, erreichten *Cole* und *Moore* durch steigende Dosen abgetöteter Kultur nur ausnahmsweise ein hochwertiges Serum; meist war dazu eine Behandlung mit steigenden, aber nicht zu großen Mengen *lebender* Kokken notwendig. Besonders vorteilhaft erwiesen sich nach dem Vorgang von *Flexner* und *Amoss*[2]) drei Einspritzungen in Abständen von je 24 Stunden mit darauf folgender Ruhepause. Zu große Dosen wirkten sowohl bei Kaninchen wie bei Pferden schädlich.

Die amerikanischen Untersucher haben zum erstenmal die grundsätzlich wichtige Tatsache festgestellt, daß bezüglich der Gewinnung guter Schutz- und Heilsera — nicht aber bezüglich der aktiven Immunisierung und Agglutininbildung — die Pneumokokken vom Typus I sich anders verhalten wie die vom Typus II und III; hochwertige Sera konnten sie nur gegen ersteren herstellen, während sie bei Typus II (Versuche an 4 Pferden und zahlreichen Kaninchen) viel schwächere und gegen Typus III noch schlechtere Sera erhielten.

Was die Agglutinine betrifft, so gingen dieselben durchaus nicht dem Schutzwert der Sera parallel. Sie zeigten weniger starke Schwankungen und erreichten in der Regel etwa einen Titer 1:200.

Bei meinen Versuchen habe ich mich an die Beobachtungen von *Cole* und *Moore* angeschlossen und dabei die Erfahrungen benutzt, die

[1]) Journ. of exp. med. **26**, 537.
[2]) Journ. of exp. med. **21**, 515.

ich bei aktiver Immunisierung von Mäusen gegen Pneumo- und Streptokokken gemacht habe. Auf Grund dieser letzten Versuche habe ich versucht, das von *Cole* und *Moore* angegebene Verfahren der Immunserumgewinnung von Kaninchen entsprechend zu modifizieren, zunächst bei Immunisierung mit dem Typus I, dann auch in einigen Versuchen mit Typus II und III. Bei der aktiven Immunisierung fand ich, daß die Virulenz der Erreger eine überaus wichtige Rolle spielt. Wenn auch die antigene Wirkung nicht immer mit der Virulenz parallel zu gehen braucht, und wenn auch stark abgeschwächte Kulturen noch eine gewisse Immunisationswirkung haben können, so ist jedenfalls die Forderung berechtigt, für die aktive Immunisierung möglichst virulente Stämme zu verwenden.

Dementsprechend habe ich auch zur Serumgewinnung in erster Linie für Mäuse hochvirulente abgetötete Pneumokokkenkulturen benutzt. Für Kaninchen waren sie aber, wie aus meiner III. Mitteilung hervorgeht, wenig virulent. Die Typus I-Stämme (Pn. Wa. und Am. I) töteten immerhin in der Menge 0,01 subcutan gegeben auch Kaninchen (in 3 Tagen), wobei Pn. Wa. durch Passagen schneller virulent wurde als Am. I. Vom Typus II wurden die Stämme Am. II und Ra. angewendet, die erst mit 0,1 ccm Kaninchen mit Sicherheit töteten (in 4—5 Tagen), hier ließ sich Stamm Ra. durch Passagen eher virulenter machen als der andere Stamm. Die zur Immunisierung gegen Typus III benutzten Stämme Am. III und Kugel wurden nicht auf Kaninchenvirulenz geprüft.

Hier liegen also bezüglich des Einflusses der Virulenz kompliziertere Verhältnisse vor als bei unseren Versuchen mit aktiver Immunisierung von Mäusen, indem die Kulturen zwar für die Tierart, an der das Serum geprüft wurde, hochvirulent waren, nicht aber für die zu immunisierenden Tiere. Die Frage, ob man durch Benutzung solcher Stämme, die auch für *Kaninchen* maximal virulent sind, andere Sera erhält, muß späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, ebenso die Frage, welchen Schutzwert unsere Sera, die wir bisher nur an Mäusen prüften, für Kaninchen haben.

Nun sind *Cecil* und *Blake*[1]) auf Grund eines Versuches, in welchem sie einen Affen durch subcutane Einspritzung von lebenden (auch für Mäuse) avirulenten Pneumokokken gegen tracheale Infektion mit einem virulenten Pneumokokkus schützen konnten, für eine derartige Immunisierung auch beim Menschen eingetreten. Ich habe mit Hinblick darauf die in der II. Mitteilung bereits erwähnten für Mäuse avirulenten Streptokokken- und Pneumokokkenstämme auch lebend zur Immunisierung von Kaninchen benutzt. Wie die Tabellen zeigen werden, wurde aber auf diese Weise nur sehr geringwertiges Serum erzielt. Diese Stämme verhielten sich allerdings, wie bereits mitgeteilt, bei der Agglutination ganz atypisch und vermochten Mäusen bei aktiver Immunisierung nur einen geringfügigen Schutz zu verleihen.

[1]) Journ. of exp. med. **31**, 657 u. 685.

## 1. Immunisierung von Kaninchen mit abgetöteten virulenten Pneumokokken des Typus I.

Was die Dosierung betrifft, so habe ich gezeigt (III. Mitt., Tab. XI), daß es für die aktive Immunisierung bei Mäusen günstig ist, wenn man wiederholt kleine Dosen in schneller Aufeinanderfolge gibt. 3 bzw. 30 ccm ergeben eine viel schlechtere Immunität als 0,3 und 0,03 ccm, wenn diese Dosen an einem Tage in 6 kleinen Einzeldosen $^1/_2$ stündlich gegeben werden; auch bei Injektion einer gleichbleibenden Impfstoffmenge (3,0 ccm) in 7 tägigen Intervallen in 3 gleichen Dosen (1 ccm) wurde ein schlechteres Ergebnis erzielt, als wenn dieselben Mengen an 3 aufeinanderfolgenden Tagen gegeben wurden; durch 6 malige Injektion von halb so großen Einzeldosen (0,5 ccm) an nur 1 Tage wurde das Ergebnis noch besser. Entgegen dem Vorgehen, wie es z. B. bei den Schutzimpfungen gegen Typhus und Cholera üblich ist, ergaben also in diesen Fällen kleine häufige Dosen eine besonders hohe Immunität.

Ich habe den Impfstoff für alle folgenden Versuche in gleicher Weise hergestellt, indem ich die Stämme in 100 ccm einer 10 proz. Serumbouillon während 18 Stunden wachsen ließ, zentrifugierte und das Sediment in 10 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufschwemmte. Die Aufschwemmung wurde während 20 Minuten auf 60° C erhitzt, auf Sterilität geprüft und im Eisschrank aufbewahrt. Der Impfstoff wurde nach dem Vorgang von *Cole* und *Moore* jede Woche frisch hergestellt, die zur Impfung gebrauchte Menge nach Schütteln intravenös injiziert. Während ich bei Prüfung der aktiven Immunität an Mäusen 14 Tage nach Abschluß der Impfung als geeignete Zeit fand, habe ich bei diesen Kaninchenversuchen, dem Beispiel von *Cole* und *Moore* folgend, stets nach 7 Tagen Blutproben entnommen und geprüft. Es wurde der Titer der Agglutination und des Schutzwertes an Mäusen nach der in der I. Mitteilung beschriebenen Methode bestimmt.

Die folgenden Versuche haben das Gemeinsame, daß stets eine Reihe schnell aufeinanderfolgender Impfdosen gegeben wurde; die Methode, einmal wöchentlich zu injizieren, ist nicht angewendet worden, nachdem *Cole* und *Moore* sie unzweckmäßig gefunden hatten. Dagegen sind große Dosen neben kleinen und mittleren vergleichend angewendet worden.

In der Tabelle I sind mehrere zu verschiedenen Zeiten ausgeführte Versuche zusammengefaßt worden. In den ersten 3 Versuchen (Kan. 276, 294, 293) habe ich den gesamten Impfstoff in 6 teils gleichen, teils steigenden $^1/_2$ stündlich verabfolgten Einzeldosen an 1 Tage gegeben. Ferner wurde mit demselben Impfstoff ein Kaninchen (Nr. 277) in derselben



*Tabelle I. Ergebnisse der Serumprüfung nach Immunisierung von Kaninchen mit Pneumokokken vom Typus I. Behandlung nach Cole und Moore und mit verschiedenen Varianten dieser Methode.*

Das Serum wird jedesmal 7 Tage nach Abschluß der Impfung geprüft. Schutzwert 0,001 bedeutet: 0,001 Serum schützt eine Maus vor Infektion mit 0,0001 ccm Bouillonkultur Pn. Wa., während die 3fach kleinere Dosis nicht mehr schützt; 0,0001± bedeutet: Das Tier starb verzögert, 0,0003 hat geschützt. Die Werte bei mit Pn. Am. I immunisierten Tieren sind eingeklammert, alle übrigen Tiere sind mit Pn. Wa. immunisiert.

| Art der Immunisierung | Zahl der Impf. in jeder Serie | | Größe der Einzeldosen | | | I. Serie | | | Eine Woche Pause, dann II. Serie | | | Eine Woche Pause, dann III. Serie | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Es erhält Kaninchen: | täglich | Impftage | I. Serie ccm | II. Serie ccm | III. Serie ccm | Ges.-meng. | Aggl. | Schutzwert | Ges.-meng. | Aggl. | Schutzwert | Ges.-meng. | Aggl. | Schutzwert |
| 276 eine Serie $^1/_2$stündl. steigende Dosen | 6 | 1 | 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 | . | . | 31,5 | 1:2 | 0,03 | . | . | . | . | . | . |
| 294 eine Serie $^1/_2$stündl. steigende Dosen | 6 | 1 | 0,1, 0,2, 0,4 0,8, 1,6, 3,2 | . | . | 6,3 | 1:2± | <0,03 | . | . | . | . | . | . |
| 293 eine Serie $^1/_2$stündl. gleiche Dosen | 6 | 1 | 1 | . | . | 6 | 1:2 | 0,03 | . | . | . | . | . | . |
| 295 eine Serie $^1/_2$stündl. gleiche Dosen | 3 | 2 | 1 | . | . | 6 | 0 | <0,03 | . | . | . | . | . | . |
| 277 eine Serie $^1/_2$stündl. gleiche Dosen | 6 | 6 | 1 | . | . | 36 | 1:50 | 0,003 | . | . | . | . | . | . |
| 988 zwei Serien täglich steigende Dosen | 1 | 6 (5) | 1, 2, 4, 8, 16, 32 | 1, 4, 16, 64, 250 | . | 63 | 1:50± | 0,02 | 398 | 1:100 | 0,003 | . | . | . |
| 987 drei Serien täglich steigende Dosen | 1 | 3 | 1, 2, 5 | 5, 20, 50 | 5, 20, 50 | 8 | . | . | 83 | 1:20 | 0,003 | 158 | 1:200 | 0,001 |
| 983 drei Serien täglich gleiche Dosen | 6 | 6 | 1 | 1 | 1 | 36 | [1:100 | 0,1±] | 72 | [1:200 | 0,001] | 108 | [1:200 | 0,0001] |
| 194 drei Serien täglich gleiche Dosen | 6 | 6 | 1 | 1 | 1 | 36 | 1:20 | 0,01 | 72 | 1:20 | 0,001 | 108 | 1:100± | 0,0001 |
| 28 drei Serien täglich gleiche Dosen | 6 | 6 | $^1/_2$ | $^1/_2$ | $^1/_2$ | 18 | 1:50 | 0,01 | 36 | 1:100 | 0,001 | 54 | 1:100± | 0,001 |
| 29 drei Serien täglich gleiche Dosen | 6 | 6 | $^1/_2$ | $^1/_2$ | $^1/_2$ | 18 | 1:100 | 0,01 | 36 | 1:50 | 0,001 | 54 | 1:100 | 0,00001± |
| 26 drei Serien täglich gleiche Dosen | 6 | 6 | $^1/_6$ | $^1/_6$ | $^1/_6$ | 6 | 1:20 | 0,01 | 12 | 1:50 | 0,01 | 18 | 1:100± | 0,00001± |
| 27 drei Serien täglich gleiche Dosen | 6 | 6 | $^1/_6$ | $^1/_6$ | $^1/_6$ | 6 | 1:50 | 0,01 | 12 | 1:50 | 0,001 | 18 | 1:100± | 0,00001 |
| 986 drei Serien täglich gleiche Dosen | 1 | 6 | 1 | 1 | 1 | 6 | . | . | 12 | [1:100 | 0,003] | 18 | [1:200 | 0,001] |
| 296 drei Serien täglich gleiche Dosen | 1 | 6 | 1 | 1 | 1 | 6 | 1:50 | 0,1 | 12 | 1:100 | 0,001 | 18 | 1:200 | 0,0001± |



Weise an 6 aufeinanderfolgenden Tagen behandelt. In einem weiteren gleichzeitig ausgeführten Versuche (Kan. 295) wurden ebenfalls 6 Dosen auf 2 aufeinanderfolgende Tage verteilt. Die Gesamtdosis war 2 mal eine mittlere (31,5 und 36 ccm), 3 mal eine recht kleine (6 und 6,3 ccm).

Die hier benutzte Methode war unserer an Mäusen erprobten nachgebildet. Bei Prüfung 7 Tage nach Abschluß der Impfung entsprach aber der Schutzwert der Sera nicht unseren Erwartungen, nur einmal, und zwar bei dem mit der größten Gesamtdosis behandelten Tiere (Nr. 277), schützten noch Bruchteile eines Zentigramms, hier war auch die agglutinierende Kraft des Serums höher (1 : 50), während sie in den übrigen Fällen kaum nachweisbar war. Die Tiere sind durchweg mit Pn. Wa.-Kultur vorbehandelt worden. Sie wurden später teils zu anderen Versuchen verwendet, teils gingen sie interkurrent zugrunde, so daß sie nicht weiter behandelt werden konnten.

In den übrigen Versuchen wurden die Kaninchen wie in den Versuchen von *Cole* und *Moore mehrmals mit dazwischen liegenden Pausen* von 7 Tagen einer Serie von Impfungen unterworfen. Ich habe diese Versuche nach der Größe der gesamten einverleibten Impfdosis geordnet. Abgesehen von zwei mit Am. I - Impfstoff immunisierten Tieren (983 und 986) wurden alle übrigen wieder mit der Kultur Wa. behandelt, und zwar 988 und 987 mit großen steigenden Dosen, 194 und 983 wie bei *Cole* und *Moore* 6 Tage nacheinander mit gleichen Impfstoffmengen; dabei wurden aber täglich 6 Einzeldosen von je 1 ccm, also 6 mal so große Mengen wie von den amerikanischen Autoren gegeben. Kan. 296 und 986 wurden nach der Methode von *Cole* und *Moore* behandelt. Diese Methode wurde dann noch in der Weise modifiziert, daß die täglichen Einzeldosen ebenfalls je 1 ccm betrugen, aber auf sechs $^1/_2$ stündliche Injektionen am Tage verteilt waren (Kan. 26 und 27) und bei Kan. 28 und 29 so, daß 6 mal täglich je $^1/_2$ ccm (also eine 3 mal so große Menge) injiziert wurde. Die Versuchsanordnung geht im übrigen aus der Tabelle hervor.

Der Stamm Wa., mit dem in den Schutzversuchen geprüft wurde, war damals von gleichbleibender hoher Virulenz. Kontrollen, die 0,0000001 und 0,00000001 ccm Serumbouillonkultur erhielten, starben regelmäßig in 2 Tagen.

Der Stamm Am. I schien uns etwas schlechter zu immunisieren als der Stamm Wa. Im übrigen ergibt sich für die Immunisierung mit Pn. I: 1. große Dosen von Impfstoff sind nicht erforderlich; 2. steigende Dosen ebenfalls nicht; 3. dagegen ist wiederholte Impfung mit Pausen dazwischen notwendig. Bei Kaninchen kann man durch eine Reihe von



Impfungen an einem Tage oder auch an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen nicht so gute Sera erhalten wie durch Wiederholung der Impfungen in 7 tägigen Intervallen.

In der Regel stieg der Titer nach der 2. Impfperiode auf das 10fache, 2mal (Kan. 983 und 296) auf das 100fache des früheren Wertes an, 1mal (Kan. 26) erfolgte keine merkliche Erhöhung des Titers. Nach der 3. Impfdosis stieg der Titer weiter um das 3—1000fache an (bei Kan. 987 und 986 auf das 3fache, bei Kan. 983, 296 und 194 auf das 10fache, bei Kan. 29 und 27 auf das 100fache und bei Kan. 26 auf das 1000fache); nur einmal (Kan. 28) blieb er auf seiner vorigen Höhe. Es zeigen sich also die größten Differenzen zwischen den angewandten Methoden erst nach längerer Behandlung mit mehrfachen Ruhepausen.

Bei diesen Endergebnissen wurden je 3 mal die Werte 0,001—0,0001 und 0,00001 erreicht. Den schlechtesten Serumtiter zeigten das mit großen steigenden Dosen behandelte Kan. 987, das eine der beiden nach der Originalmethode von *Cole* und *Moore* behandelte Kan. 986 (mit Am. I behandelt) und das mit der modifizierten amerikanischen Methode und 3facher Gesamtdosis behandelte Kan. 28. Den Titer 0,0001 erzielten die Originalmethode von *Cole* und *Moore* (Kan. 296, mit Pn. Wa. behandelt) und die modifizierte Methode mit 6 facher Gesamtdosis (Kan. 983 und 194). Noch 10mal besseres Serum lieferte ein nach der modifizierten Methode mit einer Gesamtdosis von 18 ccm behandeltes Tier (Kan. 29) und die beiden in gleicher Weise mit der Gesamtdosis von 6 ccm (täglich 6 mal $^1/_6$ ccm) behandelten Tiere (Kan. 26 und 27).

Der Agglutinationstiter ging nicht dem Schutzwert parallel und erreichte auch nicht so hohe Werte; nach der ersten Impfserie war er bei sämtlichen Tieren, die nur an einem Tage behandelt waren, ganz gering, während er bei den mehrere Tage hintereinander behandelten ziemlich hoch war. Er stieg dann nach der 2. und 3. Serie von Einspritzungen allmählich an, in jedem Falle viel langsamer als der Titer im Schutzversuch, und lag bei allen Tieren schließlich zwischen 1 : 100—200.

Hiernach scheint die Methode, die täglichen Impfgaben in mehrere Einzeldosen zu zerlegen, nicht nur für die aktive Immunisierung, sondern auch für die Serumgewinnung Vorzüge zu haben. Ebenso wie die in der vorigen Arbeit mitgeteilten Versuche zur aktiven Immunisierung von Mäusen bedürfen diese Kaninchenversuche einer Ergänzung bezüglich der Wirkung noch kleinerer Dosen; auch hier haben die kleinsten bisher versuchten Dosen bei der von mir modifizierten Methode am besten gewirkt.

Es ist aber anzunehmen, daß auch die Dauer der Ruhepause zwischen den Serien von großer Bedeutung ist. Vielleicht kann man durch längere



Zwischenräume bessere Erfolge erzielen, besonders bei größeren Dosen. Hierüber machten wir folgende Erfahrung.

Kaninchen 296, das nach 3 Impfserien den Titer 0,0001± erreicht hatte, wurde nach 7 Wochen noch einmal geprüft, die Agglutination betrug 1 : 20, der Schutzwert < 0,1. Darauf erhielt es wieder 6 Tage lang eine Behandlung nach der amerikanischen Originalmethode, wonach der Titer im Schutzversuch 0,00001± betrug.

Die Möglichkeit, daß ein nach längerer Ruhepause wiederholter Reiz zu einer Zeit, wo das Blut keine Antikörper mehr enthält, sich zu den früher erteilten Reizen summiert und den Titer über den letzten Höchststand erhebt, besteht also. Daher wird es erforderlich sein, Untersuchungen darüber anzustellen, wie groß die Ruhepause am besten gewählt wird, um Störungen der Antikörperbildung, wie sie bezüglich der Agglutinine beobachtet wurden, zu vermeiden. Erst bei einer solchen Untersuchung wird sich herausstellen, ob steigende und große Dosen in der Tat, wie es nach den mitgeteilten Versuchen den Anschein hat, das Ergebnis verschlechtern. Es ist möglich, daß ein Reiz von bestimmter Größe eine ganz andere Ruhepause erfordert als ein kleiner Reiz.

Ferner sind Untersuchungen über die Haltbarkeit der Antikörper in den nach den verschiedenen Methoden hergestellten Sera erforderlich, da sie ja zu Heilzwecken nicht kurz nach der Herstellung zur Verwendung kommen. Leider haben wir diesbezüglich bei einem sehr hochwertigen Serum (Kan. 27, Tab. I) die Erfahrung gemacht, daß es bei Prüfung 10 Wochen nach der Entnahme bedeutend in seinem Titer zurückgegangen war. Das Serum war ziemlich klar und wurde nach Zusatz von 0,5% Phenol, ohne besondere Klärungsprozesse durchzumachen, im Eisschrank aufbewahrt. Wahrscheinlich sind, wie aus manchen früheren Beobachtungen hervorgeht, Sera, die mit kleinen Impfdosen oder durch verhältnismäßig kurze Vorbehandlung gewonnen sind, im allgemeinen überhaupt weniger haltbar, als wenn größere Dosen, vielleicht auch lebende Erreger verwendet werden und die Vorbehandlung lange ausgedehnt wird. Möglicherweise ist auch die Tierart von Einfluß. Kaninchensera fand *Neufeld* bei seinen ersten Agglutinationsversuchen nur kurze Zeit haltbar, während die Agglutinine der Pferdesera (die allerdings auch wohl immer durch längere Vorbehandlung gewonnen waren) entschieden stabiler waren. Was die Schutzstoffe betrifft, so hielt sich nach den Erfahrungen von *Neufeld* und *Haendel* und den amerikanischen Forschern (Monograph Nr. 7, S. 50) der Titer ihrer Pferdesera lange auf der gleichen Höhe. Die amerikanischen Autoren fanden ihn noch nach 2 Jahren unverändert. Als einige hochwertige von *Neufeld* und *Haendel* hergestellte Pferdesera 5—8 Jahre später wieder geprüft wurden, zeigten sie jedoch weder Agglutination noch Schutzwert.



### 2. Immunisierung von Kaninchen mit Typus II.

Für diese Immunisierungsversuche habe ich die Stämme Am. II und Ra. verwendet. Sie waren ebenfalls für Mäuse hoch virulent; Dosen von 0,0000001—0,00000001 waren schon letal.

Die Versuchstiere waren in zwei Gruppen geteilt, wovon die eine 6mal täglich, die andere nur einmal täglich 1,0 ccm i. ven. erhielt. Diese Behandlung wurde bei beiden Gruppen 6 Tage lang fortgesetzt und nach Pausen von je 8 Tagen noch 2 mal bzw. 3 mal dieselbe Serie von Einspritzungen wiederholt.

*Tabelle II.*
**Immunsierung von Kaninchen nach 2 verschiedenen Methoden mit je 2 Stämmen von Pneum. II.**

| Immunisierung nach | Nach Serie | Mit Stamm Am. II | | Mit Stamm Ra. | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Aggl. | Schutz | Aggl. | Schutz |
| modifizierter amerik. Methode: täglich 6 mal 1 ccm an 6 Tagen nacheinander | I | 1 : 10 | <0,1 | 1 : 100 | 0,001 |
| | II | 1 : 20 | 0,01 | 1 : 200 | 0,0001 |
| | III | 1 : 20 | 0,01 | — | — |
| amerikanischer Original-methode: an 6 Tagen nacheinander je 1 ccm | I | — | — | 1 : 10 | <0,01 |
| | II | <1 : 10 | <0,01 | 1 : 10 | <0,01 |
| | III | 1 : 20 | <0,01 | 1 : 20 | 0,01 |
| | IV | — | — | 1 : 20 | 0,001 |

Bei diesen Versuchen konnte ich mit Stamm Am. II keine guten Resultate erzielen, bessere dagegen bei Verwendung von Stamm Ra. Hier erhielt ich mit der Methode, bei der 6 mal täglich geimpft wurde, schon nach der 2. Serie ausgezeichneten Erfolg. Noch eine Dosis von 0,0001 schützte; der Agglutinationswert war 1: 200. Mit dem gleichen Stamm konnte ich bei Anwendung der amerikanischen Methode wenigstens nach der 4. Serie ziemlich gute Erfolge erzielen: Schutz bei einer Dosis von 0,001, Agglutination 1: 20.

Diese Versuche sind wenig zahlreich; sie bestätigen die Erfahrung von *Cole* und *Moore*, daß die Antikörperbildung gegenüber den Stämmen vom Typus II schlechter ist als gegen die des Typus I, zeigen aber wohl doch, daß Kaninchen bei Auswahl eines geeigneten Stammes und geeigneter, genügend intensiver Behandlung gute Sera auch gegen den Typus II liefern können.

### 3. Immunisierung von Kaninchen mit Typus III.

Für diese Versuche habe ich die Stämme Am. III, Kugel und Nr. 2584 verwendet. Sie waren für Mäuse ebenfalls hoch virulent; Dosen von 0,0000001—0,00000001 waren letal. Auch hier habe ich die Tiere in zwei Gruppen geteilt, die beide in der beschriebenen Weise wiederholt mit einer Dosis von 1,0 ccm geimpft wurden, die eine Gruppe 6mal täglich, die andere nur einmal täglich.



*Tabelle III.*

**Immunisierung von Kaninchen nach 2 verschiedenen Methoden mit je 3 Stämmen von Pneum. III.**

| Immunisierung nach | Nach Serie | Mit Stamm Am. III | | Mit Stamm Kugel | | Mit Stamm 2584 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Aggl. | Schutz | Aggl. | Schutz | Aggl. | Schutz |
| modifizierter amerik. Methode: 6 mal täglich 1 ccm an 6 Tagen nacheinander | I | 1 : 10 ± | <0,1 | <1 : 10 | <0,1 | 1 : 10 | <0,01 |
| | II | 1 : 10 | 0,1 | 1 : 10 | <0,1 | 1 : 10 | <0,01 |
| | III | 1 : 20 ± | 0,01 | 1 : 10 | <0,1 | 1 : 50 | 0,1 |
| | IV | 1 : 200 | 0,001 | 1 : 10 | 0,1 | 1 : 100 | 0,1 |
| amerikan. Originalmethode: an 6 Tagen nacheinander 1 ccm | I | — | — | — | — | 1 : 10 | <0,01 |
| | II | 1 : 50 ± | <0,1 | 1 : 10 | <0,1 | 1 : 10 | <0,01 |
| | III | 1 : 50 | 0,01 | 1 : 10 | <0,1 | 1 : 100 | <0,1 |
| | IV | 1 : 100 | 0,01 | 1 : 10 | 0,1 | 1 : 100 | <0,1 |

Bei diesen Versuchen konnte ich nur bei täglich sechsmaliger Impfung mit dem Stamm Am. III gute Resultate erzielen und auch hier erst nach 4 Serien von Einspritzungen (im ganzen entsprechend 156 ccm Bouillonkultur). Der Schutzwert war 0,001, die Agglutination 1:200. Nach der Originalmethode von *Cole* und *Moore*, also bei 6fach geringerer Tagesdosis, erhielt ich nur einen Titer von 0,01. Die anderen beiden Stämme haben sehr schlechte Resultate ergeben.

Offenbar ist es schwer, von Pneumokokken vom Typus II und besonders Typus III gute Sera zu erhalten; hier zeigen sich die stärksten Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen desselben Typus. Die Stämme Ra., Kugel und Nr. 2584 waren von Pneumoniepatienten isoliert worden und wurden nach kurzer Zeit zur Immunisierung verwendet. Stamm Am. II und III stammen aus dem Rockefeller-Institut und sind schon längere Zeit im Laboratorium fortgezüchtet.

Bei Immunisierung mit Typus II hat nur der Stamm Ra., bei Typus III nur der Stamm Am. III gute Resultate ergeben. Daraus ist zu schließen, daß bei Immunisierung mit Typus II und Typus III der Stamm besonders sorgfältig ausgewählt werden muß, wenn man gute Resultate erzielen will. Es liegt nahe, hier einen Zusammenhang mit der Pathogenität der betreffenden Stämme für Kaninchen anzunehmen, doch haben wir diese wichtige Frage bisher nicht systematisch untersucht. Jedenfalls war der Stamm 2584 ganz avirulent für Kaninchen. Von einer auch für Mäuse völlig abgeschwächten Modifikation dieses letzteren Stammes habe ich auch *lebende* Kulturen zu Immunisierungsversuchen benutzt; dabei konnte ich, wie unten (s. Tab. IVa) mitgeteilt wird, ebenfalls keine guten Ergebnisse erzielen.

### 4. Immunisierung mit avirulenten Pneumo- und Streptokokken.

Bei meinen Versuchen zur aktiven Immunisierung von Mäusen (siehe III. Mitteilung) konnte ich mit abgetöteten avirulenten Kulturen



von Pneumokokken und Streptokokken keinen Schutz erreichen, aber auch *lebende* avirulente Kulturen ergaben nur geringe Immunität.

Bei den folgenden Versuchen habe ich Stamm Am. I und Streptokokkus Aronson benutzt. Zwecks Abschwächung züchtete ich den Pneum. Am. I 14 Tage lang bei 39°, dabei habe ich die Kulturen jeden zweiten Tag überimpft. Der auf solche Weise nach 7maliger Überimpfung gewonnene Stamm erwies sich als völlig avirulent für Mäuse; selbst Dosen von 0,5 intraperitoneal injiziert waren nicht tödlich. Durch Natrium tauroch. wurde dieser Stamm in einer Konzentration von 1:100 nur teilweise aufgelöst.

Auch von dem Streptokokkus Aronson habe ich, wie früher bereits beschrieben, eine avirulente Variante nach der Methode von *Morgenroth* hergestellt, nämlich durch Abimpfung aus der Subcutis einer 4 Stunden vorher mit dem Originalstamm infizierten Maus. Zwischen den vielen hämolytischen Kolonien erschienen auf der Platte etwa 10 Viridanskolonien. Der auf diese Weise erhaltene Viridansstamm war anfangs noch etwas virulent (er tötete eine Maus mit 0,5 i. p., mit 0,1 i. p. nicht mehr), bei der Immunisierung der Kaninchen aber zeigte er eine völlige Avirulenz (1 ccm tötete Mäuse nicht). Ebenso wurde der zum Typus III gehörige Pneumokokkus 2584, der für Kaninchen bereits avirulent war, durch Züchtung bei 39° auch für Mäuse bis zur Avirulenz abgeschwächt.

*a) Immunisierung mit abgetöteten avirulenten Pneumo- und Streptokokken.*

Der Impfstoff wird in gleicher Weise hergestellt, wie ich es oben angegeben habe, zur Impfung werden die gleichfalls bereits beschriebenen Methoden benutzt.

*Tabelle IV.*

*Immunisierung von Kaninchen mit toten avirulenten Pneumokokken* (Am. I) *und Streptokokken.*

Die Sera werden im Schutzversuch gegenüber 0,0001 ccm Serumbouillonkultur der virulenten Kokken geprüft, in den mit * und ** bezeichneten Fällen wurden kleinere abgestufte Dosen der Kultur (0,00001 und 0,000001) benutzt, in dem mit * bezeichneten Fall wurde Schutz gegen 0,000001 nicht gegen 0,00001 erzielt, in den beiden anderen Fällen auch nicht gegen die kleinste Dosis.

| Es ergibt die Immunisierung bei 8 Impfserien, jede Serie | Nach Serie | Mit Pneum. Am. I | | Mit Streptok. Aronson | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Agglutination | Schutzwert | Agglutination | Schutzwert |
| 6 mal täglich 1 ccm an 6 Tagen nacheinander | I | — | — | 1 : 400 | <0,1 |
| | II | 1 : 200 | <0,1 | 1 : 800 | <0,1 |
| | III | 1 : 400 | 0,1* | 1 : 1600 | <0,1** |
| 1 mal täglich an 6 Tagen nacheinander | I | — | — | — | — |
| | II | 1 : 200 | <0,1 | 1 : 400 | <0,1 |
| | III | 1 : 400 + | <0,1** | 1 : 800 + | <0,1 |





Wie aus Tabelle IV hervorgeht, ist es mit abgetöteten völlig avirulenten Pneumo- und Streptokokkenstämmen bei beiden Methoden (der von *Cole* und *Moore* und meiner) nicht möglich gewesen, ein gegen virulente Stämme wirksames Serum zu gewinnen. Die Sera der Kaninchen, die mit abgetöteten avirulenten Streptokokken vorbehandelt waren, schützen in einer Dosis von 0,1 nicht gegen 0,0001 Streptokokkenkultur, auch nicht gegen noch kleinere Mengen. Die Sera, die mit abgetöteten avirulenten Pneumokokken gewonnen waren, ergaben in einer Dosis von 0,1 ebenfalls keinen oder nur einen äußerst geringen Schutz. Nur ein Serum schützte gegen 0,000001 Pneumokokkenkultur. Dagegen enthielten diese Sera, sowohl die gegen Pneumo- wie die gegen Streptokokken reichlich Agglutinine, die sich aber, wie in der II. Mitteilung beschrieben, z. T. ausschließlich gegen die zur Immunisierung benutzten (avirulenten) Stämme richteten; auch die Agglutinationswerte in den Tab. IV und IV a beziehen sich auf die avirulenten Stämme.

*b) Immunisierung mit lebenden avirulenten Pneumo- und Streptokokken.*

Bei weiteren Versuchen habe ich *lebende* Kulturen benutzt, die in der oben beschriebenen Weise abgeschwächt worden waren. Jedes Kaninchen wurde wiederum in drei Serien behandelt.

*Tabelle IVa.*

*Immunisierung von Kaninchen mit lebenden avirulenten Kulturen von Pneumokokken* (Typ I u. III) *und Streptokokken.* Immunsierung nach *Cole* und *Moore.* Prüfung 7 Tage nach der 3. Impfserie. Kulturdosis im Schutzversuch 0,0001 ccm wie früher; die Serumdosen sind 1 : 10 usw. abgestuft.

| Bei Impfung von je 2 Kaninchen mit | Pneum. Am. I | | Strept. Aronson | | Pneum. 2584 (Typ. III) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ergibt | Agglutination | Schutzwert | Agglutination | Schutzwert | Agglutination | Schutzwert |
| das 1. Tier | 1 : 200 | 0,1 | 1 : 1000 ... | < 0,1 | 1 : 25<br>(1 : 100 ·) | 0,1<br>(0,01 ±) |
| das 2. Tier | · | · | 1 : 1000 ... | < 0,1 | 1 : 10 | 0,1<br>(0,01 ±) |

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, konnte ich auch mit *lebenden* avirulenten Kulturen kein irgend hochwertiges Serum erzeugen. Bei der Immunisierung mit avirulenten lebenden Pneumokokken ergab 0,1 Serum Schutz gegen 0,0001 Pneumokokkenkultur, während eine Serummenge von 0,01 höchstens den Tod verzögert. Gegen Streptokokken wurde gar kein wirksames Schutzserum gewonnen, dagegen agglutinierte das Serum den eigenen (abgeschwächten) Stamm recht hoch (1 : 1000).



## 5. Immunisierung mit virulenten Streptokokken.

Ich habe für diese Versuche den Stamm Aronson benutzt. Er war für Mäuse hoch virulent. Die Dosis letalis betrug 0,00000001—0,000000001. Ein Kaninchen wurde in 3 Serien (6 mal täglich je 1 ccm), ein anderes nach der amerikanischen Methode immunisiert.

*Tabelle V.*

*Ergebnis der Serumprüfung nach Immunisierung von* (je 2) *Kaninchen mit toten virulenten Kulturen von Streptokokken* (*Aronson*). Der Schutzwert der Sera wurde gegenüber Infektion mit 0,0001 ccm Kultur bestimmt, die Serumverdünnungen wurden dabei 1 : 10 usw. abgestuft.

| Es ergibt die Immunisierung bei 3 Impfserien, jede Serie | Mit virulenten toten Streptokokken | | |
|---|---|---|---|
| | Nach Serien | Agglutination | Schutzwert |
| 6 mal täglich 1 ccm an 6 Tagen nacheinander | I | · | 0,01 (0,001 ) |
| | II | 1 : 400 | 0,001 (0,0001 ) |
| | III | 1 : 800 | 0,0001 |
| 1 mal täglich 1 ccm an 6 Tagen nacheinander | I | · | · |
| | II | 1 : 200 | 0,01 |
| | III | 1 : 400 | 0,01 |

Aus den Versuchen geht hervor, daß die Methode, bei der 6mal täglich injiziert wird, sich besser bewährt hat als die von *Cole* und *Moore*, wie es auch bei der Immunisierung mit Typus II und Typus III von Pneumokokken der Fall war. Mit dieser Methode erhielt ich ein Serum, von dem 0,0001 gegen 0,0001 Streptokokken schützte. Von dem mit der amerikanischen Methode erhaltenen Serum schützt erst 0,01 gegen 0,0001 Streptokokkenkultur. Auch hier erwies sich also die von mir angewendete Immunisierungsmethode als die wirksamste; das nach kurzer Vorbehandlung erhaltene Serum war sogar erheblich hochwertiger als ein von der Fabrik Schering bezogenes Pferdeserum.

## Schlußsätze.

In Bestätigung der Angaben von *Cole* und *Moore* erhielt ich hochwertige Schutzsera gegen Pneumokokkus I von Kaninchen, wenn ich den Tieren 6 Tage hintereinander täglich die aus 1 ccm Bouillonkultur ausgeschleuderten abgetöteten Pneumokokken intravenös einspritzte und eine solche Serie von Einspritzungen mit 8 tägigen Pausen 3 mal wiederholte.

Noch bessere Sera lieferten Kaninchen, die die gleichen Dosen, jedoch verteilt auf 6 Einspritzungen in Zwischenräumen von $^1/_2$ Stunde erhielten.



Nur mit dieser letzteren Methode konnte ich auch gegen Pneum. II ein ganz hochwertiges, gegen Pneum. III ein mäßig gutes Serum gewinnen, aber nur bei Benutzung gewisser Stämme dieser Typen, während andere Stämme ganz schlechte Sera ergaben. Wie *Cole* und seine Mitarbeiter fanden, ist es sehr schwierig, wirksame Schutzsera gegen Pneum. des Typus II und besonders III zu erzeugen; hier kommt es daher am meisten auf die Wahl des Stammes und der Methode an.

Die gleiche Methode (der 6maligen Injektion an einem Tage) ergab auch bei einigen Versuchen mit Streptokokken weitaus das beste Serum.

Kaninchen, die mit abgetöteten oder auch lebenden avirulenten Pneumokokken I und Streptokokken behandelt wurden, hatten meist gar keine, in einzelnen Fällen ganz geringe Mengen von Schutzstoffen im Serum.

Die Frage der Haltbarkeit der Pneumokokkenantikörper in nach verschiedenen Methoden gewonnenen Sera bedarf weiterer Prüfung.

(Aus dem Hygienischen Institut der Universität Basel [Vorsteher: Prof. *Doerr*.])

# Studien zum Bakteriophagenproblem.

## III. Mitteilung.

## Die antagonistische Wirkung von Gelatine und Agar auf den Ablauf der Bakteriophagenreaktion.

Von

**R. Doerr** und **W. Berger.**

Es war zuerst *Doerr* aufgefallen, „*daß sich in Gelatineplatten, die man aus einer stark bakteriophagenhaltigen Kulturbouillon anfertigt, die vorhandenen, noch lebenden Bakterien ungestört zu Kolonien entwickeln, obzwar die Lysinkonzentration* (*als lysinhaltige Bouillon*) *ausgereicht hätte, um die Bakterien zu zerstören*". Um zu ermitteln, auf welche Ursachen diese antibakteriophage oder antilytische Wirkung der Gelatine zurückzuführen sei, stellte *Doerr* folgenden Versuch an:

*Versuch I.*

Nährbouillon ($p_H = 7{,}65$) wurde mit steriler Nährgelatine (18% Gelatine $p_H = 7{,}6$) vermengt, und zwar in wechselnden Proportionen. Die Gemische kamen in größere Eprouvetten, deren Inhalt nachstehende Zusammensetzung hatte:

| Nr. der Eprouvette | Nährgelatine in ccm | Bouillon in ccm | Gesamtvolum | Reine Gelatine in % |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0 | 9 | 9 | 0 |
| 2 | 1 | 9 | 10 | 1,8 |
| 3 | 2 | 9 | 11 | 3,3 |
| 4 | 5 | 9 | 14 | 6,4 |
| 5 | 9 | 9 | 18 | 9,0 |
| 6 | 9 | 0 | 9 | 18 |

Alle Röhrchen wurden durch Einstellen in ein Wasserbad von 37° C auf diese Temperatur gebracht, hierbei — soweit sie gelatinierbar waren — verflüssigt, mit je 0,01 ccm eines Colilysins ($e_L = 8$) und je einer Öse einer 16stündigen Bouillonkultur eines empfindlichen Colistammes („Coli sensibel") beimpft und unter Vermeidung einer stärkeren Abkühlung in einen Thermostaten gebracht.

Nach 14 Stunden bot der Inhalt der Röhrchen folgendes Bild:

Die reine Bouillon in der ersten Eprouvette war während der ganzen Dauer der Bebrütung völlig klar geblieben.

Die Röhrchen Nr. 2 bis einschließlich 4 zeigten sämtlich *Trübungen*, welche durch die Vermehrung der eingesäten Bakterien bedingt waren und mit steigendem Gelatinegehalt zunahmen. Die Bakterien waren größtenteils *zu makroskopisch*



*sichtbaren Flöckchen verklumpt. Gasbildung fehlte* in diesen drei Gelatinekonzentrationen durchwegs.

In den Röhrchen 5 und 6 war *starke Trübung, grobflockige Agglutination, außerdem aber auch reichliche Entwicklung von Gasblasen* wahrzunehmen.

Kontrollröhrchen, welche reine Nährgelatine enthielten und nur mit „Coli sensibel", nicht aber mit dem zugehörigen Bakteriophagen (Lysin) beschickt wurden, wichen nach 14stündigem Aufenthalt im Thermostaten nur insofern vom Aussehen des Röhrchens Nr. 6 ab, als die bakterielle Trübung mehr homogen war; *die Agglutination fehlte.*

Eine tabellarische Anordnung der Resultate ergab also:

| | Gas: | Bakt. Trübung: | Agglutination: |
|---|---|---|---|
| 1 (0% Gel.) | θ | θ | θ |
| 2 (1,8% Gel.) | θ | + | + |
| 3 (3,3% Gel.) | θ | ++ | +++ |
| 4 (6,4% Gel.) | θ | ++++ | +++ |
| 5 (9,0% Gel.) | + | ++++ | +++ |
| 6 (18% Gel.) | ++ | ++ | +++ |

Nach Ablesung der Ergebnisse blieben die Röhrchen bei Zimmertemperatur stehen (ca. 15° C); der Inhalt derjenigen, welche Gelatine enthielten, erstarrte, ein Beweis, daß sich die Gelatine nicht tiefgreifend verändert haben konnte. In den Röhrchen 5 und 6 (9 resp. 18% Gelatine) machte die Gasbildung bei 15° C weitere Fortschritte, so daß schließlich der starre Nährboden von einer großen Anzahl birnförmig verlängerter Gasblasen durchsetzt und aufgebläht war; die Röhrchen 2—4 ließen auch nach mehrtägigem Stehen in der Zimmerwärme keine Gasproduktion erkennen.

Die naheliegende Vermutung, daß das Auskeimen von Bakterien in lysinhaltigen Gelatineplatten vielleicht darauf beruhen könnte, daß man solche Platten bei 15—20° hält, also bei Temperaturen, bei denen sich die Bakterien nur langsam entwickeln und vermehren, während man die Bakteriophagenreaktion in Bouillon bei 37° ablaufen läßt, hatte sich demnach nicht bestätigt: *die antibakteriophage Wirkung der Gelatine trat bei 37° ebenso deutlich zutage wie bei 15°.* Gleichzeitig war aber auch erwiesen, *daß der antagonistische Effekt der Gelatine nicht von der besonderen Struktur der Gallerte abhängen kann, die ja bei der Verflüssigung durch Erwärmen zerstört wird.* Es hatte sich vielmehr herausgestellt, daß schon sehr geringe Gelatinekonzentrationen die Lyse hemmen und daß etwas höhere sie ganz verhindern. Aber erst bei sehr hohen Gelatinekonzentrationen glichen die Röhrchen annähernd einer unbeeinflußten Colikultur in flüssiger, bei 37° gehaltener Nährgelatine, in welcher sich die Mikroben in Abwesenheit des lytischen Prinzips entwickeln konnten. Zwischen die beiden Extreme war ein Bereich eingeschaltet, welcher durch fehlende Gasbildung und grobflockige Agglutination charakterisiert war. Die Agglutination kann man, wie schon *d'Hérelle* an einer Stelle erwähnt, auch bei Bakteriophagenreaktionen in Bouillon als rasch vorübergehende, prälytische Erscheinung feststellen, besonders dann, wenn vor Eintritt der

Lyse eine stärkere, als makroskopisch sichtbare Trübung konstatierbare Bakterienvermehrung stattfindet; doch ist sie nie so ausgeprägt, so klumpig und so haltbar wie im Gelatinemedium. *Doerr* faßte die unter dem Einfluß des bakteriophagen Faktors eintretende Flockung der Bakterienkulturen als die physikalische Folge einer durch Bakterienerkrankung bedingten Oberflächenveränderung der Bakterienzellen auf, in welchem Falle also der *veränderte, abnorme Stoffwechsel der Mikroben als primärer*, die *Schädigung der Oberfläche* als *sekundärer* Prozeß, die *Verklumpung* endlich als *Wirkung der Elektrolyten des flüssigen Milieus auf die modifizierten Bakterienmembranen* zu gelten hätte.

Es soll nun versucht werden, die antilytischen Effekte der Gelatine genauer zu analysieren.

Zu diesem Zwecke schien es uns wünschenswert, die erwähnte antagonistische Wirkung auf irgendeine Weise zu messen. Die eben geschilderte Versuchsanordnung eignete sich wenig; das Fehlen oder Eintreten der Gasbildung und die Mächtigkeit der in der flüssigen Gelatine entstandenen, aus agglutinierten Bakterien bestehenden Sedimente gestatteten kaum eine approximative Schätzung. Wohl aber war es möglich, das Volumen des produzierten Gases zu bestimmen und auf diese Weise quantitative Anhaltspunkte zu gewinnen.

*Versuch II.*

18% Nährgelatine (mit 0,5% Glucose) wurde mit 0,5% Traubenzuckerbouillon vom gleichen $p_H$ vermengt, so daß Gemische resultierten mit 3,6, 6,0, 7,4, 8,5 und 9% Gelatine. In einer Serie betrug der $p_H$ 5, in einer zweiten 7, in der dritten 9. — Die Gemenge wurden im Wasserbad verflüssigt, mit je 0,2 ccm Colilysin ($e_L = 8$) und je einer Öse 14stündiger Colibouillonkultur beimpft, in Gärungskölbchen gefüllt und in den Thermostaten gebracht. Die Mengen des produzierten Gases, nach 48 Stunden abgelesen, betrugen in Kubikzentimetern:

| | *Gelatinegehalt:* | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0% | 3,6% | 6% | 7,4% | 8,5% | 9% |
| $p_H = 5$ | 3,5 ccm | 1,5 ccm | 3 ccm | 3,5 ccm | — | 3,5 ccm |
| $p_H = 7$ | 5,0 „ | 0 „ | Spur | 5,0 „ | 5,0 ccm | 5,0 „ |
| $p_H = 9$ | 5,0 „ | 0 „ | „ | 5,0 „ | 5,0 „ | 5,0 „ |

Die erste Horizontalreihe scheidet für die Betrachtung aus, da es bekannt ist, daß ein zu niedriger $p_H$ an sich (d. h. ohne Mitwirkung der Gelatine) die Bakteriophagenreaktion teilweise oder ganz verhindert (*Gratia*, eigene, nicht veröffentlichte Untersuchungen); infolgedessen wird hier ein höherer antagonistischer Effekt der Gelatine vorgetäuscht, als man nach Versuch 1 erwarten würde. Immerhin läßt sich doch aus den Zahlen herauslesen, daß 3,6—6% Gelatine nicht genügen, um den Einfluß des Lysins auf die Bildung von Gas aus Glucose ganz zu unterdrücken. Zwischen $p_H = 7$ und $p_H = 9$ liegen die für den Ablauf des Bakteriophagenphänomens optimalen H-Ionenkonzentrationen, und da zeigt sich



1. daß bei einem Gelatinegehalt des Nährmediums von 7,4% oder darüber die Gasbildung genau so intensiv ist, als wenn sich die Colibakterien im gleichen, aber lysinfreien Kultursubstrat entwickelt hätten. Die Beeinflussung der Bakterien durch das Lysin kommt somit in der Gasproduktion überhaupt nicht mehr zum Ausdruck;

2. daß 6% Gelatine (oder etwas weniger) die Grenze repräsentieren, unterhalb welcher überhaupt kein Gas gebildet wird. In diesem Bereich verhalten sich also die Bakterien (hinsichtlich der Gasbildung aus Glucose) so, als ob keine Gelatine vorhanden wäre.

Nur in der schmalen Zone zwischen 6 und 7,4% Gelatinegehalt (vielleicht ist sie in Wahrheit noch enger begrenzt) könnte man also Abstufungen erwarten, welche für Meßbestrebungen eine Angriffsfläche bieten.

Wir mußten uns daher nach einem anderen Indicator umsehen, welcher die Beziehungen zwischen Lysin- und Gelatinegehalt des Nährmediums besser zum Ausdruck bringt, und wählten die *Zahl der Keime, welche sich in einer starren Gelatine von bestimmter Lysin- und Gelatinekonzentration zu Kolonien entwickeln*; als Vergleichsobjekt dienten lysinfreie Gelatineplatten, die mit den gleichen Bakterienmengen wie die eigentlichen Versuchsplatten beschickt worden waren. Die Details können aus dem Protokoll eines der zahlreichen Vorversuche ohne weiteres entnommen werden.

*Versuch III.*

Je 10 ccm 18% Nährgelatine vom $p_H = 7$ wurden im flüssigen Zustande mit je 1 ccm fallender Verdünnungen einer Lysinbouillon vermischt, mit gleichen Mengen (je 0,2 ccm) einer sehr dünnen Suspension von Dysenteriebacillen (Stamm „*Lauda*") beimpft und zu Platten ausgegossen, die bei 17° C gehalten und nach 4 Tagen ausgezählt wurden. Das konzentrierte Dysenterielysin hatte den Lysinexponenten 9 und die Verdünnungen erfolgten im Verhältnis von 1 : 10, so daß sich für den Lysingehalt der Gelatineplatten annäherungsweise die Exponenten 8, 7, 6, 5 usw. ergaben, vorausgesetzt, daß das Lysin in Gelatine ebenso quantitativ erhalten bleibt wie in Bouillon, eine Voraussetzung, welche — wie noch gezeigt werden wird — tatsächlich zutrifft. Die Ergebnisse gestalteten sich folgendermaßen:

| Lysinexponent der Gelatineplatte: | Anzahl der Kolonien: |
|---|---|
| — 8 | 10 |
| — 7 | 240 |
| — 6 | 400 |
| — 5 | 460 |
| — 4 | 420 |
| — 3 | 450 |
| — 2. | 440 |
| — 1 | 460 |
| 0 | 450 |
| + 1 | 420 |
| Kontrolle ohne Lysin | 460 |
| „ „ „ | 430 |





Auch 18 proz. Gelatine hatte somit den Einfluß des Lysins auf die Bakterienentwicklung nicht vollständig zu paralysieren vermocht, falls das Lysin in genügend starker Konzentration ($e_L = 7$ bis 8) zugegen war; erst vom Lysinexponenten —6 angefangen, löschte die Gelatine die Lysinwirkung komplett aus, es bestand keine Differenz gegenüber dem Wachstum im lysinfreien Medium.

Es war nun weiters zu ermitteln:

1. wie sich verschiedene Gelatinekonzentrationen verhalten,

2 ob auch andere Kolloide, vor allem Agar-Agar, ähnliche Wirkungen entfalten und

3. ob die Temperatur, bei welcher man die Bacillen zu Kolonien auskeimen läßt, eine Rolle spielt, eine Frage, die sich allerdings mit dem Gelatineverfahren wegen des niedrigen Schmelzpunktes der Gelatine nicht lösen läßt, die aber im Falle der Anwendbarkeit der Agartechnik keine besonderen Schwierigkeiten bot.

Um alle 3 Fragen gleichzeitig zu beantworten, wurden in der Anordnung des Versuches IV alle erforderlichen Varianten berücksichtigt.

*Versuch IV.*

Es wurden Zählplatten angelegt mit fallenden Lysinmengen und gleichen Mengen Shigabacillen (Stamm „Lauda"). Im ganzen wurden 5 Serien solcher Platten angefertigt, und zwar:

Serie 1 mit 18% Nährgelatine,
„ 2 „ 10% „
„ 3 „ 5% „
„ 4 „ $2^1/_2$% Agar,
„ 5 „ $2^1/_2$% „

Zu jeder Serie kamen noch 2 Kontrollplatten (lysinfreie Nährboden) hinzu. Die Platten der Serien 1, 2, 3 und 4 wurden nach 4tägigem Stehen bei 15° C, jene der Serie 5 nach 18stündigem Aufenthalt im Thermostaten ausgezählt. Das konzentrierte Lysin hatte den Exponenten —9; zu je 9 ccm Nährböden der 1. Vertikalreihe wurde 1 ccm dieses konzentrierten Lysins, zu je 9 ccm der 2. Vertikalreihe 0,1 ccm, zu je 9 ccm der 3. Reihe 0,01 ccm usf. hinzugesetzt, so daß sich für den Lysingehalt der Nährböden die Exponenten —8, —7, —6 usw. ergaben.

Resultate:

*Lysinexponenten*:

| | −8 | −7 | −6 | −5 | −4 | −8 | −2 | −1 | 0 | Kontr. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Serie 1. 18% Gelatine | 133 | 620 | 740 | 750 | 820 | 820 | 810 | — | 840 | 790 |
| Serie 2. 10% Gelatine | 1 | 260 | 790 | 860 | 820 | 810 | 810 | 840 | 880 | 810 |
| Serie 3. 5% Gelatine | 2 | 1 | 220 | 820 | 820 | 870 | 880 | 870 | 860 | 870 |
| Serie 4. 2,5% Agar (15° C) | 1 | 0 | 0 | 1 | 370 | 730 | 730 | 740 | 780 | 780 |
| Serie 5. 2,5% Agar (37 °C) | 0 | 1 | 0 | 1 | 620 | 780 | 850 | 860 | 850 | 850 |

Aus diesem durch zahlreiche Kontrollen gestützten Versuche kann man schließen:



1. *daß die antagonistische Wirkung der Gelatine ceteris paribus mit ihrer Konzentration zunimmt,* indem immer stärkere Lysinkonzentrationen notwendig werden, um die Entwicklung der Keime zu Kolonien ganz oder teilweise zu verhindern,

2. daß auch eine 18 proz. Gelatine den Einfluß hoher Lysinkonzentrationen (Exponenten von —8 und darüber) nicht kompensiert,

3. *daß Agar-Agar ebenfalls den bakterienschädigenden Einfluß des Lysins unterdrückt* und daß die Intensität seiner antagonistischen Wirkung schätzungsweise jener der Gelatine gleichkommt, wenn man Nährmedien miteinander vergleicht, welche gleiche Gewichtsprozente von trockener Gelatine und trockenem Agar enthalten,

4. daß die Temperatur die antagonistischen Eigenschaften der Agargallerte nicht wesentlich modifiziert,

5. daß der Mechanismus der Agar- oder Gelatinewirkung nicht einfach so aufgefaßt werden kann, daß die Lysinpartikel in der erstarrenden Gallerte an verschiedenen Punkten festgehalten werden und daß nur jene Mikroben zu makroskopisch sichtbaren Ansiedelungen heranwachsen, welche nicht von vornherein neben ein Lysinpartikel zu liegen kommen oder deren Nachkommen nicht infolge der Vermehrungsexpansion mit einem solchen Teilchen in Kollision geraten. Diese Auffassung würde die antagonistischen Effekte der Gallerten auf den rein mechanischen Faktor *der Distanzierung der „Lysinelemente“* zurückführen und eine Erklärung für die Erscheinung geben, daß die Kolonienzahl im Versuch mit steigender Lysinkonzentration abnimmt. Aber sie kann mit mehreren Momenten nicht in befriedigende Übereinstimmung gebracht werden. Vor allem entwickeln sich bei gleicher Lysinkonzentration (gleicher Menge von „Lysinpartikeln“) sehr ungleiche Zahlen von Kolonien (bei $e_L = -6$ z. B. zwischen 0 und 800), je nach dem Gehalt des Nährbodens an Gelatine oder Agar, obwohl die Distanzierung der „Lysinelemente“ in einer 18 proz. Gelatine ebenso beschaffen sein muß wie in einer 5 proz. oder in einem $2^1/_2$ proz. Agar. Zweitens aber tritt der antilytische Effekt der Gelatine auch in flüssigen, sogar in recht dünnflüssigen gelatinehaltigen Medien in Erscheinung, wo die räumliche Trennung von Bakterienzelle und Lysinelement wegfällt. Schließlich ist es ja noch mehr als fraglich, ob man sich die Verteilung des Lysins in wässerigen Flüssigkeiten oder Hydrogelen so grobdispers denken darf, oder ob nicht eine viel feinere und gleichmäßigere Aufteilung nach Art der hydrophilen Eiweißkolloide dem wahren Verhalten dieser Substanz entspricht.

Welche Vorstellungen soll man sich aber über den Mechanismus der Agar- und Gelatinewirkung eigentlich machen? *Neutralisieren oder adsorbieren die Kolloide das Lysin?* Das scheint nicht der Fall zu sein, da man aus sterilen Gemengen von Gelatine und Lysin auch



nach länger dauerndem Kontakt das zugesetzte Lysin quantitativ zurückgewinnen kann, und zwar durch einfaches Verdünnen mit Nährbouillon.

*Versuch.*

10 ccm Bouillon und 10 ccm Nährgelatine werden mit dem gleichen Volumen derselben Lysinverdünnung versetzt, so daß die sofort ausgeführte Titration der Bouillon den Lysinexponenten — 3 ergibt. Das Gelatineröhrchen wird 18 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt, dann verflüssigt und sein Inhalt genau so titriert, als ob es sich um eine Lysinbouillon handeln würde; es wird der gleiche Lysinexponent (— 3) ermittelt wie in der Bouillon.

Die Möglichkeit, daß *lockere Lysin-Gelatine-Verbindungen* entstehen, die beim bloßen Verdünnen mit Bouillon wieder dissoziieren, hat a priori wenig Wahrscheinlichkeit für sich und widerspricht auch der Tatsache, daß das Lysin selbst durch hohe Gelatinekonzentrationen nicht völlig außer Aktion gesetzt wird, sondern den Bakterienstoffwechsel unzweifelhaft tiefgreifend verändert. Enthält das Nährsubstrat bis zu 6% Gelatine, so wird die Bildung von Gas aus Glucose verhindert und selbst bei 18% Gelatine verklumpen die Mikroben zu größeren Aggregaten, statt das flüssige Medium homogen zu trüben; zu diesen Beobachtungen, welche schon *Doerr* beschrieben und als Dystrophie, als hormonale Stoffwechselerkrankung der Bakterien gedeutet hat, können wir nun noch eine weitere wichtige Tatsache hinzufügen: *die Bakterien produzieren in lysinhaltiger Gelatine geradeso Lysin wie in lysinhaltiger Bouillon.* Nach den Untersuchungen von *Doerr* und *Grüninger* sowie von *Meuli* läuft die Bakteriophagenreaktion in einer Bouillon von niedriger Ausgangskonzentration des Lysins so ab, daß sich zunächst die eingesäten Bakterien vermehren und daß gleichzeitig die Konzentration des Lysins rapide ansteigt, bis sie einen gewissen Wert (entsprechend dem Lysinexponenten — 6) überschreitet; dann setzt die Auflösung der Bakterien ein und kurze Zeit darauf macht der Lysinanstieg bei einem für jede Bakterien-Bakteriophagen-Kombination annähernd konstanten Titer (der terminalen oder maximalen Lysinkonzentration) halt. *Nicht anders verhalten sich die Dinge in flüssiger Nährgelatine.*

*Versuch.*

Ein Ausgangslysin für Shigabacillen vom Titer $e_L = -10$ wird fortschreitend im Verhältnis von 1 : 10 verdünnt, so daß der Titer des 6. Verdünnungsröhrchens nur mehr — 4 beträgt. Von dieser Verdünnung wird je 0,1 ccm zu einer Reihe von Röhrchen zugesetzt, von denen jedes 10 ccm verschiedener Gemenge von Bouillon und Nährgelatine enthält; der Gelatinegehalt war von 0—18% variiert. Der Lysinexponent der Bouillon-Gelatine-Mischungen belief sich am Beginne des Versuches auf — 2, da eben 0,1 ccm vom Exponenten — 4 zu 10 ccm zugesetzt, das Lysin somit 100fach verdünnt worden war. Nun wurde jedes Röhrchen (nach Verflüssigung im Wasserbade) mit 1 Öse 16stündiger Shiga-Bouillonkultur beimpft und alle Röhrchen in den Thermostaten gebracht. Nach 18stündigem



Stehen bei 37° C wurden die Trübungen abgelesen, die Röhrchen hierauf durch einstündiges Erwärmen auf 57° C sterilisiert und für einige von ihnen der Lysinexponent durch die Titration nach *Werthemann* ermittelt.

*Gelatinegehalt* der einzelnen Eprouvetten in %:

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 3,6 | 5,4 | 7,2 | 9,0 | 10,8 | 12,6 | 14,4 | 18 |
| *Trübung n. 18 Std.:* | 0 | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| *Lysinexponent:* | —10 | —10 | —9 | —9 | | | —8 | —8 | |

Der Lysinexponent stieg demnach, obwohl die Lyse — nach dem Trübungsgrade des Nährmediums beurteilt — völlig ausgeblieben war, beträchtlich von — 2 auf — 8 bis — 10, d. h. die Lysinkonzentration nahm auch bei ansehnlichem Gelatinegehalt des Reaktionsmilieus (3,6—14,4%) um das Millionen- bis Hundertmillionenfache zu. Das ließ sich auch mit der Versuchsanordnung zeigen, welche *Doerr* und *Grüninger* in Anwendung gebracht haben, um die Lysinzunahme in Bouillonkulturen als Funktion der Zeit darzustellen.

*Versuch.*

Ein Glaskolben, welcher 200 ccm 10 proz. Nährgelatine vom $p_H = 7,2$ enthält, wird in einem Wasserbad von 37° C vorgewärmt, bis die (flüssig gewordene) Gelatine diese Temperatur angenommen hat. Hierauf werden 0,00002 ccm eines konzentrierten Colilysins und 0,1 ccm einer 16stündigen Bouillonkultur von „Coli sensibel" zugesetzt und mit der Gelatine durch Schwenken innig vermengt. Der Kolben bleibt während der ganzen Versuchsdauer im Wasserbad. Nach verschiedenen Zeitintervallen werden Proben entnommen und 1. auf ihren Keimgehalt (Gelatinezählplatten mit 0,001 ccm Kolbeninhalt), 2. auf ihre Lysinkonzentration (nach vorausgegangenem 1stündigem Erwärmen auf 57° C), 3. auf ihren Trübungszustand untersucht. Die Resultate der Ablesungen sind der nachstehenden Tabelle zu entnehmen:

*Tabelle.*

| Zeit in Min. | Transparenz. | Lysinexponent | Keimzahl |
|---|---|---|---|
| 0 | klar | 2 | 68 Mille |
| 10 | „ | 2 | 66 „ |
| 30 | „ | 2 | 66 „ |
| 60 | Spur trübe | 2 | 188 „ |
| 90 | „ | 3 | 609 „ |
| 120 | leichte Trübung | 4 | 2 120 „ |
| 150 | zunehmende Trübung | 4 | 6 550 „ |
| 180 | deutliche Trübung | 6 | 18 900 „ |
| 210 | starke Trübung | 7 | 39 500 „ |
| 240 | intensive, diff. Trübung | 9 | 154 000 „ |
| 300 | „ „ „ | 9 | 5 600 „ |
| 480 | „ „ „ | 9 | 1 000 „ |

Man erkennt die Inkubation des Lysinanstieges, welche angenähert der Latenz der Bakterienvermehrung entspricht, und sieht, daß sich an diese Phase die Periode fortschreitender Vervielfältigung der Mikroben und zunehmender Lysinkonzentration anschließt. Aber diese zweite Etappe wird nicht (wie in gelatinefreier Bouillon) von einer rapiden Ab-

nahme der Bakterienzahlen unterbrochen, sobald der Lysinexponent des Mediums den Wert —5 resp. —6 überschreitet; vielmehr hält sie an, bis das Maximum erreicht ist ($e_L = -9$), und erst dann nehmen die Bakterienzahlen ab, aber nicht bis zur Sterilisation des Milieus. Auch bleibt die Klärung völlig aus, selbst in diesem letzten Stadium; die Bakterien sterben zwar zum Teile ab, die eigentümliche, das Transparentwerden des Mediums bedingende Auflösung wird aber offenbar hintangehalten. Daß die bloß 10proz. Gelatine die Mikroben gegen die schädigenden Einflüsse sehr hoher Lysinkonzentrationen nicht mehr völlig schützt, sondern daß schließlich beim Exponenten —9 ein stärkeres Bakteriensterben einsetzt, war nach den Ergebnissen der Bakterienzüchtung in lysinhaltiger, erstarrter Gelatine zu erwarten.

Aus dem Zusammenhalt aller dieser Versuche ergibt sich zunächst ein weiteres Argument gegen die Auffassung, welche *die Lysinzunahme aus dem Untergange der Mikroben, aus der Auflösung ihrer Leiber ableiten will; im Gelatinemedium tritt der Zerfall gar nicht ein und trotzdem schwillt der Lysinspiegel im umgebenden Medium fast so rasch und so hoch an wie in der Bouillon, in welcher sich ausgiebige lytische Vorgänge abspielen.* Ferner läßt sich aber auch konstatieren, daß das Ausbleiben der Lyse nicht in der Weise zu erklären ist, daß die Lysinkonzentration den für die Lyse notwendigen Schwellenwert nicht erreicht resp. nicht überschreitet. In flüssiger Gelatine werden — wie gezeigt wurde — Lysinexponenten von —8 bis —10 durch die Tätigkeit der beeinflußten Bakterien zustande gebracht, Konzentrationen, welche in Bouillon stets genügen, um eine ausgiebige, oft bis zur völligen Entkeimung fortschreitende Bakteriolyse einzuleiten und zu unterhalten. Erstarrter Gelatine kann man von Haus aus solche für die Lyse suffiziente Mengen des wirksamen Prinzips zusetzen, ohne daß deswegen die Entwicklung von Kolonien aus einzelnen Keimen in der Gallerte unterdrückt werden muß.

Die Sache liegt somit so, *daß in der Gelatine dieselben krankhaften Veränderungen an den Mikroben auftreten wie in der Bouillon:* die Verklumpungstendenz, Anomalien in der Sekretion der für die Bakterienspezies charakteristischen Carbohydrasen, das in der Erbfolge der Individuen des Stammes für längere oder kürzere Zeit fixierte lysinogene Vermögen und eine verschieden stark ausgeprägte, teils selbständige, teils mit Lysinproduktion kombinierte Lysinresistenz. Belege dafür, daß in Gelatinemedien lysinogene, lysinresistente und mit beiden Eigenschaften datierte Rassen von größerer oder geringerer Beständigkeit entstehen, brauchen wir wohl an dieser Stelle nicht beizubringen; jedermann kann sich hiervon durch einfache Versuchsanordnungen überzeugen. *Die Gelatine verhindert, strenggenommen, nur den Endakt der Bakteriophagenreaktion, die Cytolyse.* Bedenkt man, daß sich die

Wirkung der Gelatine — solange die Bakterienzellen leben — nur auf die äußere Fläche der Membran erstrecken kann, daß aber gerade Membranläsionen als Ursachen der verschiedenartigsten cytolytischen Prozesse erkannt sind, berücksichtigt man endlich, daß das Auftreten solcher Membranschädigungen bei der Bakteriophagenreaktion durch die Agglutinationsphänomene in hohem Grade wahrscheinlich gemacht wird, so kommt man zu folgender Ansicht: In Medien von nicht allzu hohem Lysingehalt wachsen und vermehren sich die Bakterien, erkranken aber infolge des Lysinreizes. Das wichtigste Symptom des pathologisch modifizierten Bakterienstoffwechsels ist die Absonderung neuer, beträchtlicher Lysinmengen, wobei es gleichzeitig zu einer progressiven Membranschädigung kommt, welche bei entsprechender Lysinkonzentration in der Außenflüssigkeit den Zellzerfall ermöglicht. Gelatine verhindert (ebenso wie Agar) in einer derzeit noch unbekannten Weise die Folgen der Membranschädigungen, vielleicht schafft sie auf einer Membranseite ein kolloidales Gegengewicht und bremst dadurch den Austritt von Stoffen aus dem Zellinneren; doch betritt man damit bei dem heutigen Stande der Versuchsergebnisse jedenfalls schon das Gebiet bloßer Vermutungen.

Für das Zustandekommen einer Membranschädigung im Laufe der Bakteriophagenreaktion suchten wir experimentelle Beweise auch in der Art zu erbringen, daß wir Bouillonkulturen, in welchen es zur Auflösung von Shigabacillen durch Einwirkung eines korrespondierenden Lysins gekommen war, einerseits auf ihr agglutinogenes Vermögen, andererseits auf ihre Toxizität für (intravenös injizierte) Kaninchen prüften. Diese Titrationen wurden mit Keimzählungen und Messungen der Lysinexponenten kombiniert und hatten bei zwei Experimenten das Resultat, daß die Bakteriophagenreaktion *das agglutinogene Vermögen*, welches vor dem Zusatz von Lysin zur Kultur bestanden hatte, *nicht merklich steigerte, während die Giftigkeit eine erhebliche Zunahme erfuhr*. Eine dritte Wiederholung der sehr komplizierten, viel Zeit und Material beanspruchenden Versuchsanordnung ließ jedoch das Zurückbleiben des agglutinogenen Vermögens nicht erkennen, so daß wir auf eine Wiedergabe des umfangreichen Protokolls vorläufig verzichten und nur darauf hinweisen, daß eine Bestätigung der auffälligen Diskrepanz zwischen Agglutinogengehalt und Giftigkeit gelöster Bakterienkulturen die Auffassung einer trophischen Defektuosität der Bakterien (speziell ihrer Hüllen) stützen könnte. Vorderhand erschien uns die erneute experimentelle Bearbeitung dieses Themas nicht opportun, da sie klarere Einblicke in die Bedingungen, unter denen der Leib der Shigabacillen toxisch wird, voraussetzt, als sie auf Grund der vorhandenen Literaturangaben zu gewinnen sind.

## *Zusammenfassung.*

1. Gelatine, Agar-Agar und andere Kolloide (Gummi, lösliche Stärke) behindern den Ablauf der Bakteriophagenreaktion.

2. Die Gelatine entfaltet diesen hemmenden Einfluß sowohl im flüssigen Zustand wie als Gallerte.

3. Die antagonistische Wirkung der Gelatine wächst mit der Konzentration. Zwischen gleichen Konzentrationen (Gewichtsprozenten) von Agar und Gelatine scheint kein erheblicher Unterschied zu bestehen.

4. Der antibakteriophage Effekt kommt sowohl bei 15 wie bei 37° zustande.

5. In Gelatine- oder Agar-*Gallerten* manifestiert sich die Schutzwirkung des Kolloids dadurch, daß eingesäte Keime trotz des Lysingehaltes der Gallerten zu Kolonien auswachsen, falls dieser Lysingehalt eine bestimmte Grenze nicht überschreitet. Die Lysinkonzentration, gegen welche die Gelatine die wuchernden Bakterien schützt, rückt um so weiter hinauf, je mehr Gelatine das Nährsubstrat enthält.

6. In flüssigen Gelatinemedien variiert die Intensität der Schutzwirkung ebenfalls mit der Gelatinekonzentration. Erst 6% Gelatine ermöglichen die Gasbildung aus Glucose durch Bact. coli. Eine Beeinflussung der Bakterien durch das Lysin findet aber auch in den höchsten Gelatinekonzentrationen statt und äußert sich durch Verklumpung der Mikroben, Lysinproduktion und durch die Entstehung lysinogener und resistenter Rassen.

7. Am stärksten behindert flüssige Gelatine *den Endakt der Bakteriophagenreaktion, die Lyse*. Es wird diskutiert, wie sich aus dieser Tatsache und aus den die Bakteriophagenreaktion begleitenden Agglutinationserscheinungen die Annahme einer (dystrophischen) Membranläsion ableiten läßt.

8. Da in flüssiger Gelatine die Bakteriolyse ausbleibt, die Lysinproduktion aber fast ebenso lebhaft ist wie in Bouillon, erscheint die Hypothese von der Lysinentstehung durch Bakterienzerfall derzeit unhaltbar.

---



(Aus der Akademischen Kinderklinik in Düsseldorf [Dir.: Geh.-Rat *Schlossmann*].)

# Über die antigenen Fähigkeiten verschiedener Kaltblütertuberkelbacillen und die Erkennung der durch sie bewirkten spezifischen Gewebsumstimmung mittels der Tuberkulinreaktion.

## Zugleich ein Beitrag zur Frage der Stellung des Friedmannbacillus im System der säurefesten Stäbchen.

Von
Privatdozentin Dr. **Selma Meyer.**

Mit 2 Textabbildungen.

Das Problem der antigenen Wirkung der Kaltblütertuberkelbacillen und anderer säurefester Stäbchen hat nicht nur theoretisches Interesse, sondern hat praktische Bedeutung gewonnen durch die Erkenntnis, daß die *spezifische Gewebsumstimmung des Warmblüterorganismus die Grundlage des Tuberkuloseschutzes* bildet. Wir dürfen an die spezifisch erworbene Fähigkeit, auf eine Substanz des Tuberkelbacillus mit Entzündung zu reagieren und spezifisches Gewebe neu zu bilden, die Vorstellung eines Schutzmechanismus knüpfen und den Grad dieses Schutzes geradezu an der mehr oder minder großen Fähigkeit zur Neubildung tuberkulösen Gewebes messen (*Bessau*). Diese Fähigkeit wird aber nur allmählich erworben; nur nach längerer Einwirkung an bestimmter Stelle zwingt das spezifische Agens die umgebenden Gewebe zur Umstimmung, wandeln sich die Zellen in „Tuberculocyten", Zellen mit spezifischer Funktion, um. Das schnell und leicht resorbierbare Tuberkulin hat daher wegen der Flüchtigkeit der Einwirkung wahrscheinlich keine gewebsumstimmende Kraft, die schwer resorbierbaren Bacillen entfalten bei künstlicher Einbringung wie bei spontaner Infektion antigene Wirkungen. Ist an einer Stelle des Körpers die Umstimmung erfolgt, so teilt sie sich bald allen Zellen des Körpers mit, und dann gewinnen diese auch die Fähigkeit, schon auf den flüchtigen Tuberkulinreiz hin neues tuberkulöses Gewebe zu bilden. Die Tuberkulinreaktion ist also der klinisch wahrnehmbare Ausdruck der erfolgten allgemeinen Allergie,

die Lokalreaktion ein Zeichen der an beliebiger Stelle des Körpers möglichen Neubildung tuberkulösen Gewebes und selbst ein neu entstandener tuberkulöser Herd. Die Erzeugung dieser lokalen Tuberkulinempfindlichkeit muß daher die Grundlage eines künstlich zu erreichenden Tuberkuloseschutzes bilden und *der Erfolg einer immunisierenden Impfung mit Kaltblütertuberkelbacillen in erster Linie abhängig sein von ihrer biologischen Aktivität, von ihrer Fähigkeit, den Warmblüter bis zur Erzeugung spezifischen Gewebes auf Tuberkulinreiz hin umzustimmen.* Dann aber muß es von ausschlaggebender Bedeutung sein, *ob sich diese Umstimmung auch als wirksam gegen den Warmblüterbacillus erweist,* also Schutz gegen die Infektion mit humanen und bovinen Bacillen verleiht oder nur eine Immunisierung gegen den Kaltblütertuberkelbacillus bedeutet, die praktisch keinen Wert hat. Die Tuberkulinreaktion muß diesen Nachweis liefern können. Nach Vorbehandlung mit Kaltblütertuberkelbacillen beweist eine positive Tuberkulinreaktion mit humanem oder bovinem Tuberkulin eine erfolgreiche Immunisierung gegen den Warmblüterbacillus, gleichzeitig eine nahe Verwandtschaft zwischen Kaltblüter- und Warmblüterbacillus; eine positive Reaktion nur auf das stammeseigene Tuberkulin würde das Zeichen einer einseitigen, praktisch belanglosen Umstimmung gegen den Kaltblüterbacillus sein. Negative Tuberkulinreaktion stempelt die Injektion von Kaltblütertuberkelbacillen zur unspezifischen Proteinkörperinjektion.

Bisher ist es nicht gelungen, Menschen und Tiere (Meerschweinchen) durch Vorbehandlung mit Kaltblüterbacillen und anderen säurefesten Stäbchen gegen Warmblüterbacillentuberkulin überempfindlich zu machen. [Nur *Friedmann* hatte angeblich nach Injektion seiner Schildkrötenbacillen bei tuberkulinnegativen Neugeborenen eine positive cutane Alttuberkulinreaktion, die bis zur völligen Aufsaugung des Impfinfiltrates positiv blieb. Bei der Nachprüfung seiner Versuche konnte aber das gleiche Resultat nicht erzielt werden (*Selter*, *Meyer*, *Severin*).] Damit ist der Nutzen prophylaktischer Kaltblüterbacilleninjektionen problematisch geworden. Der humane Bacillus dagegen konnte den Warmblüterorganismus doch für das Tuberkulin aus Kaltblütertuberkelbacillen (Schildkröten-Wasser-Timotheebacillen) sensibilisieren, ebenso für die intracutan injizierten Schildkröten - Frosch - Wasser - Trompeten - Timothee - Smegmabacillen. Mit der empfindlichen Intracutanprobe bei bestimmter, nicht zu geringer Dosierung des Tuberkulins sind sowohl tuberkulöse Menschen wie tuberkulös gemachte Meerschweinchen zu einer positiven Reaktion gebracht worden (*Möller*, *Selter*, *Ludwig Lange*, *Dietrich*, *Sons* und *von Mikulicz-Radecki*, *B.* und *E. Lange*, *Meyer* und *Severin*). Mit großen Dosen von Schildkrötenbacillentuberkulin haben *Uhlenhuth*



und *Lange* bei tuberkulösen Meerschweinchen auch typischen Tuberkulintod eintreten sehen. Das spricht für die *größere biologische Energie des humanen Tuberkelbacillus*, zugleich für eine *gewisse Verwandtschaft der Tuberkuline oder doch bestimmter Antigengruppen der beiden Bacillenarten.* Die positive Reaktion auf Saprophytentuberkuline muß ferner als echte elektive Überempfindlichkeitsreaktion angesehen werden, nicht als unspezifische Proteinkörperwirkung, darf auch nicht der allgemeinen Reizbarkeit tuberkulöser Organismen zugeschrieben werden, denn gleichzeitig angestellte Kontrollinjektionen von Milch, Pferdeserum, Glycerinhefewasser (dem eingeengten Nährboden der Bacillen) riefen keine Lokalreaktionen hervor.

Die Reaktionen der einzelnen Tuberkuline ließen auffällige qualitative Unterschiede nicht erkennen, nur erwies sich das Schildkrötenbacillentuberkulin wiederholt als das biologisch wirksamste. Daraus geht immerhin eine nähere Verwandtschaft zum humanen Bacillus hervor, als sie den anderen Kaltblüterbacillen zukommt. Im allgemeinen gingen die Saprophytentuberkulinreaktionen den Alttuberkulinreaktionen parallel, ihre Schwellenwerte lagen aber höher, 10 bis 100 mal, selten 1000 mal höher als die des Alttuberkulins (*B.* und *E. Lange*).

Mit dieser Fähigkeit zur Erzeugung von Überempfindlichkeitsreaktionen im tuberkulösen, also schon sensibilisierten Organismus ist aber noch nicht die selbständige umstimmende Kraft der säurefesten Stäbchen erwiesen. Dazu mußten tuberkulosefreie Individuen mit säurefesten Saprophyten vorbehandelt und mit dem Tuberkulin des zur Injektion verwandten Stammes nachgeprüft werden. Solche Untersuchungen sind von mir gemeinsam mit *Severin* an Kindern und Meerschweinchen angestellt worden. Den Kindern wurden *Friedmann*sche Schildkrötenbacillen in der Dosis von 3 mg intramuskulär (intraglutäal) eingespritzt und nach 5, 9, 14, 20, 30, 60, 120 Tagen die intracutane Prüfung mit dem Tuberkulin des gleichen Bacillenstammes, teilweise auch mit dem Tuberkulin eines anderen Schildkrötenbacillus angeschlossen. Mit wenigen Ausnahmen waren alle Reaktionen positiv, die Kontrollreaktionen mit humanem Tuberkulin negativ. Die intraperitoneal vorgespritzten Meerschweinchen starben in den ersten 3 Tagen nach der Tuberkulininjektion unter den Erscheinungen des Tuberkulintodes, während die Kontrollen mit Alttuberkulin am Leben blieben.

Aus den bisher angestellten Versuchen geht also folgendes hervor:

1. Die säurefesten Stäbchen können den Warmblüterorganismus nicht überempfindlich machen für das Tuberkulin des humanen Tuberkelbacillus.



2. Der humane Tuberkelbacillus kann den Warmblüterorganismus mit umstimmen für das Tuberkulin anderer säurefester Stäbchen. (Diese Säurefesten und ihre Tuberkuline geben Überempfindlichkeitsreaktionen am tuberkulösen Organismus.)

3. Die Schildkrötentuberkelbacillen *Friedmanns* können den Warmblüterorganismus selbständig umstimmen, aber nur einseitig für das Tuberkulin des eigenen Stammes.

Aus den Versuchen und ihren Resultaten ergaben sich neue Fragen. *Kommen den anderen säurefesten Stäbchen dieselben antigenen Eigenschaften zu?* Ist die umstimmende Kraft an eine allen gemeinsame Komponente, etwa die Säurefestigkeit, gebunden, oder hat der Friedmannbacillus dank seiner besonderen Eigenschaften auch die besondere Fähigkeit, allein echte Überempfindlichkeit zu erzeugen? Sind die Kaltblütertuberkelbacillen und anderen säurefesten Stäbchen nur Saprophyten, oder besteht auch biologische wie morphologische und kulturelle Artgleichheit mit dem Friedmannbacillus? Die Frage ließ sich entscheiden durch eine einfache Versuchsanordnung: Vorbehandlung eines Warmblüters mit einem säurefesten Bacillenstamm und Prüfung mit dem aus ihm hergestellten Tuberkulin. Ferner: Wenn die säurefesten Stäbchen antigene, gewebsumstimmende Kraft hatten, beschränkte sich die geschaffene Allergie dann streng einseitig auf den eigenen Stamm, oder *war die Verwandtschaft mit den anderen Säurefesten nah genug, um zwischen dem Antigen eines Stammes und dem Tuberkulin eines beliebigen anderen Stammes eine Reaktion hervorzubringen*? Endlich, welche nähere oder fernere Verwandtschaft zwischen den einzelnen Arten, besonders zwischen dem sogenannten Friedmannbacillus und den anderen Kaltblüterbacillen deckten die Reaktionen auf? Auch diese Fragen waren einfach zu lösen. Nach Vorbehandlung mit einem beliebigen säurefesten Stamm gaben die am gleichen Individuum gleichzeitig und mit gleicher Dosierung angestellten intracutanen Tuberkulinproben mit dem Tuberkulin des zur Injektion verwandten Stammes und verschiedener anderer Stämme Aufschluß über bestehende oder fehlende Verwandtschaft, evtl. durch Grad oder Art der Reaktion auch über den Verwandtschaftsgrad. Solche Versuche habe ich[1]) an Kindern und in Parallelversuchen an Meerschweinchen angestellt.

Zur Vorbehandlung wurden Schlangen-, Frosch-, Schildkröten- und Trompetenbacillen verwandt[2]). Die Kulturen waren auf Glycerinschräg-

[1]) Gemeinsam mit Doktoranden der Human- und Veterinärmedizin; s. Dissertation *A. Hoffmann*, Bonn 1922, *W. Heimbüchel* und *E. Thomashoff*, Gießen 1922.

[2]) Die Schlangen- und Froschbacillen waren uns freundlicherweise vom Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt, die Trompetenbacillen vom Hygienischen Institut der Universität Berlin zur Verfügung gestellt worden. Die

agar teils in dicken, feuchten Rasen (Schlangen- und Schildkrötenbacillen), teils in trockenen, krümeligen Kolonien (Frosch- und Trompetenbacillen) gewachsen. Die mikroskopischen Präparate der einzelnen Arten zeigten gerade oder gebogene Stäbchen, die bei gleichem Alter von ziemlich gleichmäßiger Dicke und nur wenig verschiedener Länge waren. Die Vaccinen wurden von etwa 8 Tage alten Kulturen durch Verreibung von je 2 mg feuchter Bakterienmasse in 4 ccm physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und den Kindern in Dosen von je 1 mg intraglutäal, den Tieren zu 0,5 mg oder 1 mg subcutan injiziert. Zur Herstellung der Tuberkuline wurden die Bacillen (Schlangen-, Frosch-, Schildkrötenbacillen) auf Glycerinbouillon überimpft und 17 Tage bei Zimmertemperatur gehalten. Sie überwuchsen schnell die Bouillonoberfläche in zusammenhängenden Kolonien, die Schlangentuberkelbacillen in besonders dicken, üppigen, fettigen Rasen mit strahligen Falten und Runzeln. Die Tuberkuline werden dann nach der *Koch*schen Vorschrift durch Einengung des Nährbodens auf $^1/_{10}$ des ursprünglichen Volumens hergestellt. Neben diesen Kaltblüterbacillentuberkulinen verwandten wir humanes Tuberkulin — und zwar Cutituberkulin, wegen der besonders starken Hautreaktionen, die es hervorrufen soll — und in den Tierversuchen auch bovines Tuberkulin. Die Tuberkulinprüfung geschah durchweg *intracutan*, bei Kindern an der Beugefläche der Unterarme, bei Meerschweinchen an einer enthaarten Stelle des Bauches.

Die Tuberkulinverdünnungen wurden jedesmal frisch hergestellt. Es kamen bei Kindern Verdünnungen von 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000 zur Verwendung, also bei Injektion von $^1/_{10}$ ccm der Tuberkulinverdünnung Dosen von 1 mg, $^1/_{10}$ mg und $^1/_{100}$ mg Alttuberkulin. Die Meerschweinchen erhielten 0,04 g und 0,08 g. Wir machten uns für diese Dosen die Erfahrungen von *B.* und *E. Lange* zunutze, nach denen geringere Tuberkulinmengen bei Meerschweinchen keine oder nur atypische positive Reaktionen hervorrufen. Kranke Kinder wurden zu den Versuchen nicht herangezogen, nur Rekonvaleszenten nach solchen Krankheiten, die im allgemeinen die Tuberkulinreaktion nicht beeinträchtigen. Alle Kinder befanden sich in stationärer klinischer Behandlung. Kontrollprüfungen mit allen Tuberkulinen wurden an unvorbehandelten Kindern und Tieren angestellt, um etwaige Reaktionen am normalen, nicht umgestimmten Körper auszuschließen, ferner Intracutaninjektionen von physiologischer Kochsalzlösung angeschlossen.

Schildkrötenbacillen entstammten einer Ampulle des Seruminstituts in Oelzschau mit der Aufschrift: Friedr. Franz, Friedmannsches Tuberkuloseheil- und -schutzmittel. Starke Emulsion. Sie waren von mir überimpft und weiter gezüchtet worden.



Die Versuche gliederten sich in 3 Reihen:

1. Tuberkulosefreie, tuberkulinnegative Individuen wurden ohne Vorbehandlung mit Schlangen-, Frosch- und Schildkrötenbacillentuberkulin sowie mit humanem und bovinem Tuberkulin und physiologischer Kochsalzlösung intracutan gespritzt.

2. Tuberkulinnegative Individuen wurden in verschiedenen Gruppen:

a) mit Schlangentuberkelbacillen,
b) „ Froschtuberkelbacillen,
c) „ Schildkrötentuberkelbacillen,
d) „ Trompetenbacillen

vorbehandelt und nach 2 bzw. 3, 4 Wochen jedes mit den unter 1. genannten Tuberkulinen intracutan geprüft.

3. Tuberkulöse Individuen werden in gleicher Weise mit allen Tuberkulinen geprüft[1]).

Bedeutung der Abkürzungen:

TSchl = Schlangenbacillentuberkulin;
TFr = Froschbacillentuberkulin;
TSchi = Schildkrötenbacillentuberkulin;
TCuti = Cutituberkulin;
Tbov = Bovines Tuberkulin;
r = geringe Rötung;
R = starke Rötung;
i = geringe Infiltration;
I = starke Infiltration;
sc = subcutan;
iglt = intraglutäal;
+ = atypische positive Reaktion (*Römer*), Rötung von mindestens 5 : 5 mm Durchmesser ohne Infiltration;
++ = typische positive Reaktion, Rötung und Infiltration von mindestens 5 : 5 mm Durchmesser;
+++ = Kokardreaktion, breit aufsitzende starke Infiltration von einem flachen roten Hof umgeben.

In den Tabellen sind die nach 24 und 48 Stunden abgelesenen Intracutanreaktionen angegeben[2]).

---

[1]) Die Versuche der Reihe III waren schon unternommen und zum großen Teil abgeschlossen, als die Veröffentlichung von *B.* und *E. Lange* (Dtsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 8) über ähnliche Versuche und, wie ich vorwegnehmen will, mit ähnlichen Resultaten erschien. Ich teile trotzdem die Protokolle und Ergebnisse mit, weil eine Bestätigung ja nur erwünscht sein kann.

[2]) Es sind der Raumersparnis wegen nicht alle Tabellen veröffentlicht, sondern von jeder Versuchsreihe nur eine, um genaue Angaben über den Grad der Reaktionen machen zu können.



*Tabelle I.* I. Reihe.

1. Tuberkulinnegative Kinder mit Kaltblüterbacillentuberkulinen und mit humanem Tuberkulin geprüft.

| Nr. | Name und Alter | Intracutanimpfungen mit | | | | | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | TSchi 0,001 g | TSchl 0,001 g | TFr 0,001 g | TCuti 0,001 g | Physiol. NaCl-Lös. | |
| 1 | Gerhard Sto. $2^1/_2$ J. | — | — | — | — | — | |
| 2 | KurtR., $2^1/_3$ J. | — | — | — | — | — | |
| 3 | Alfred K. | — | — | — | — | — | |
| 4 | Hans H., 2 J. | Nach 48 Std. + r 5 : 5 mm nach 72 Std. — | — | — | Nach 48 Std. + r 5 : 5 mm nach 72 Std. — | — | War erkrankt an Influenza m. Pneumonie |

2. Unvorbehandelte Meerschweinchen mit Kaltblüter-Cuti- und Rinderbacillentuberkulinen geprüft.

| Nr. | | Intracutanimpfungen mit | | | | | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | TSchi 0,04 g | TSchl 0,04 g | TFr 0,04 g | TCuti 0,04 g | Tbov. 0,04 g | |
| 1 a | — | — | — | — | — | — | — |
| 2 a | — | — | — | — | — | — | — |
| 3 a | — | — | — | — | — | — | — |
| 4 a | — | — | — | — | — | — | — |
| 5 a | — | — | — | — | — | — | — |

*Epikrise*: Die als Vorversuch aufzufassende I. Versuchsreihe hatte ein einheitliches Ergebnis: *Kaltblüter- wie Warmblüterbacillentuberkuline konnten im unvorbehandelten, nicht umgestimmten Organismus keine Reaktionen hervorrufen.* Die eine (teilweise) Ausnahme (Hans H.) findet eine einfache Erklärung. Das Kind war mit einer Influenzapneumonie eingeliefert und während des akuten Krankheitsstadiums anergisch, daher tuberkulinnegativ. (Die Influenza kann in manchen Fällen ähnlich den Masern eine positive Tuberkulinempfindlichkeit vorübergehend zum Erlöschen bringen.) Nach seiner Genesung erwies sich das Kind als schwach allergisch für humanes und Schildkrötenbacillentuberkulin. Es mußte also vorher durch den humanen Tuberkelbacillus umgestimmt sein. Die gleichzeitige Reaktion auf Schildkrötenbacillentuberkulin und nur auf dieses bei mangelnder Anspruchsfähigkeit auf die anderen Tuberkuline deutet aber auf eine nähere Verwandtschaft des Friedmannbacillus mit dem humanen Bacillus als der anderen Kaltblüterbacillen mit dem Typus humanus.

die Lokalreaktion ein Zeichen der an beliebiger Stelle des Körpers möglichen Neubildung tuberkulösen Gewebes und selbst ein neu entstandener tuberkulöser Herd. Die Erzeugung dieser lokalen Tuberkulinempfindlichkeit muß daher die Grundlage eines künstlich zu erreichenden Tuberkuloseschutzes bilden und *der Erfolg einer immunisierenden Impfung mit Kaltblütertuberkelbacillen in erster Linie abhängig sein von ihrer biologischen Aktivität, von ihrer Fähigkeit, den Warmblüter bis zur Erzeugung spezifischen Gewebes auf Tuberkulinreiz hin umzustimmen.* Dann aber muß es von ausschlaggebender Bedeutung sein, *ob sich diese Umstimmung auch als wirksam gegen den Warmblüterbacillus erweist,* also Schutz gegen die Infektion mit humanen und bovinen Bacillen verleiht oder nur eine Immunisierung gegen den Kaltblütertuberkelbacillus bedeutet, die praktisch keinen Wert hat. Die Tuberkulinreaktion muß diesen Nachweis liefern können. Nach Vorbehandlung mit Kaltblütertuberkelbacillen beweist eine positive Tuberkulinreaktion mit humanem oder bovinem Tuberkulin eine erfolgreiche Immunisierung gegen den Warmblüterbacillus, gleichzeitig eine nahe Verwandtschaft zwischen Kaltblüter- und Warmblüterbacillus; eine positive Reaktion nur auf das stammeseigene Tuberkulin würde das Zeichen einer einseitigen, praktisch belanglosen Umstimmung gegen den Kaltblüterbacillus sein. Negative Tuberkulinreaktion stempelt die Injektion von Kaltblütertuberkelbacillen zur unspezifischen Proteinkörperinjektion.

Bisher ist es nicht gelungen, Menschen und Tiere (Meerschweinchen) durch Vorbehandlung mit Kaltblüterbacillen und anderen säurefesten Stäbchen gegen Warmblüterbacillentuberkulin überempfindlich zu machen. [Nur *Friedmann* hatte angeblich nach Injektion seiner Schildkrötenbacillen bei tuberkulinnegativen Neugeborenen eine positive cutane Alttuberkulinreaktion, die bis zur völligen Aufsaugung des Impfinfiltrates positiv blieb. Bei der Nachprüfung seiner Versuche konnte aber das gleiche Resultat nicht erzielt werden (*Selter, Meyer, Severin*).] Damit ist der Nutzen prophylaktischer Kaltblüterbacilleninjektionen problematisch geworden. Der humane Bacillus dagegen konnte den Warmblüterorganismus doch für das Tuberkulin aus Kaltblütertuberkelbacillen (Schildkröten-Wasser-Timotheebacillen) sensibilisieren, ebenso für die intracutan injizierten Schildkröten - Frosch - Wasser - Trompeten - Timothee - Smegmabacillen. Mit der empfindlichen Intracutanprobe bei bestimmter, nicht zu geringer Dosierung des Tuberkulins sind sowohl tuberkulöse Menschen wie tuberkulös gemachte Meerschweinchen zu einer positiven Reaktion gebracht worden (*Möller, Selter, Ludwig Lange, Dietrich, Sons* und *von Mikulicz-Radecki, B.* und *E. Lange, Meyer* und *Severin*). Mit großen Dosen von Schildkrötenbacillentuberkulin haben *Uhlenhuth*

und *Lange* bei tuberkulösen Meerschweinchen auch typischen Tuberkulintod eintreten sehen. Das spricht für die *größere biologische Energie des humanen Tuberkelbacillus*, zugleich für eine *gewisse Verwandtschaft der Tuberkuline oder doch bestimmter Antigengruppen der beiden Bacillenarten.* Die positive Reaktion auf Saprophytentuberkuline muß ferner als echte elektive Überempfindlichkeitsreaktion angesehen werden, nicht als unspezifische Proteinkörperwirkung, darf auch nicht der allgemeinen Reizbarkeit tuberkulöser Organismen zugeschrieben werden, denn gleichzeitig angestellte Kontrollinjektionen von Milch, Pferdeserum, Glycerinhefewasser (dem eingeengten Nährboden der Bacillen) riefen keine Lokalreaktionen hervor.

Die Reaktionen der einzelnen Tuberkuline ließen auffällige qualitative Unterschiede nicht erkennen, nur erwies sich das Schildkrötenbacillentuberkulin wiederholt als das biologisch wirksamste. Daraus geht immerhin eine nähere Verwandtschaft zum humanen Bacillus hervor, als sie den anderen Kaltblüterbacillen zukommt. Im allgemeinen gingen die Saprophytentuberkulinreaktionen den Alttuberkulinreaktionen parallel, ihre Schwellenwerte lagen aber höher, 10 bis 100 mal, selten 1000 mal höher als die des Alttuberkulins (*B.* und *E. Lange*).

Mit dieser Fähigkeit zur Erzeugung von Überempfindlichkeitsreaktionen im tuberkulösen, also schon sensibilisierten Organismus ist aber noch nicht die selbständige umstimmende Kraft der säurefesten Stäbchen erwiesen. Dazu mußten tuberkulosefreie Individuen mit säurefesten Saprophyten vorbehandelt und mit dem Tuberkulin des zur Injektion verwandten Stammes nachgeprüft werden. Solche Untersuchungen sind von mir gemeinsam mit *Severin* an Kindern und Meerschweinchen angestellt worden. Den Kindern wurden *Friedmann*sche Schildkrötenbacillen in der Dosis von 3 mg intramuskulär (intraglutäal) eingespritzt und nach 5, 9, 14, 20, 30, 60, 120 Tagen die intracutane Prüfung mit dem Tuberkulin des gleichen Bacillenstammes, teilweise auch mit dem Tuberkulin eines anderen Schildkrötenbacillus angeschlossen. Mit wenigen Ausnahmen waren alle Reaktionen positiv, die Kontrollreaktionen mit humanem Tuberkulin negativ. Die intraperitoneal vorgespritzten Meerschweinchen starben in den ersten 3 Tagen nach der Tuberkulininjektion unter den Erscheinungen des Tuberkulintodes, während die Kontrollen mit Alttuberkulin am Leben blieben.

Aus den bisher angestellten Versuchen geht also folgendes hervor:

1. Die säurefesten Stäbchen können den Warmblüterorganismus nicht überempfindlich machen für das Tuberkulin des humanen Tuberkelbacillus.



2. Der humane Tuberkelbacillus kann den Warmblüterorganismus mit umstimmen für das Tuberkulin anderer säurefester Stäbchen. (Diese Säurefesten und ihre Tuberkuline geben Überempfindlichkeitsreaktionen am tuberkulösen Organismus.)

3. Die Schildkrötentuberkelbacillen *Friedmanns* können den Warmblüterorganismus selbständig umstimmen, aber nur einseitig für das Tuberkulin des eigenen Stammes.

Aus den Versuchen und ihren Resultaten ergaben sich neue Fragen. *Kommen den anderen säurefesten Stäbchen dieselben antigenen Eigenschaften zu?* Ist die umstimmende Kraft an eine allen gemeinsame Komponente, etwa die Säurefestigkeit, gebunden, oder hat der Friedmannbacillus dank seiner besonderen Eigenschaften auch die besondere Fähigkeit, allein echte Überempfindlichkeit zu erzeugen? Sind die Kaltblütertuberkelbacillen und anderen säurefesten Stäbchen nur Saprophyten, oder besteht auch biologische wie morphologische und kulturelle Artgleichheit mit dem Friedmannbacillus? Die Frage ließ sich entscheiden durch eine einfache Versuchsanordnung: Vorbehandlung eines Warmblüters mit einem säurefesten Bacillenstamm und Prüfung mit dem aus ihm hergestellten Tuberkulin. Ferner: Wenn die säurefesten Stäbchen antigene, gewebsumstimmende Kraft hatten, beschränkte sich die geschaffene Allergie dann streng einseitig auf den eigenen Stamm, oder *war die Verwandtschaft mit den anderen Säurefesten nah genug, um zwischen dem Antigen eines Stammes und dem Tuberkulin eines beliebigen anderen Stammes eine Reaktion hervorzubringen*? Endlich, welche nähere oder fernere Verwandtschaft zwischen den einzelnen Arten, besonders zwischen dem sogenannten Friedmannbacillus und den anderen Kaltblüterbacillen deckten die Reaktionen auf? Auch diese Fragen waren einfach zu lösen. Nach Vorbehandlung mit einem beliebigen säurefesten Stamm gaben die am gleichen Individuum gleichzeitig und mit gleicher Dosierung angestellten intracutanen Tuberkulinproben mit dem Tuberkulin des zur Injektion verwandten Stammes und verschiedener anderer Stämme Aufschluß über bestehende oder fehlende Verwandtschaft, evtl. durch Grad oder Art der Reaktion auch über den Verwandtschaftsgrad. Solche Versuche habe ich[1]) an Kindern und in Parallelversuchen an Meerschweinchen angestellt.

Zur Vorbehandlung wurden Schlangen-, Frosch-, Schildkröten- und Trompetenbacillen verwandt[2]). Die Kulturen waren auf Glycerinschräg-

[1]) Gemeinsam mit Doktoranden der Human- und Veterinärmedizin; s. Dissertation *A. Hoffmann*, Bonn 1922, *W. Heimbüchel* und *E. Thomashoff*, Gießen 1922.

[2]) Die Schlangen- und Froschbacillen waren uns freundlicherweise vom Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt, die Trompetenbacillen vom Hygienischen Institut der Universität Berlin zur Verfügung gestellt worden. Die





agar teils in dicken, feuchten Rasen (Schlangen- und Schildkrötenbacillen), teils in trockenen, krümeligen Kolonien (Frosch- und Trompetenbacillen) gewachsen. Die mikroskopischen Präparate der einzelnen Arten zeigten gerade oder gebogene Stäbchen, die bei gleichem Alter von ziemlich gleichmäßiger Dicke und nur wenig verschiedener Länge waren. Die Vaccinen wurden von etwa 8 Tage alten Kulturen durch Verreibung von je 2 mg feuchter Bakterienmasse in 4 ccm physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und den Kindern in Dosen von je 1 mg intraglutäal, den Tieren zu 0,5 mg oder 1 mg subcutan injiziert. Zur Herstellung der Tuberkuline wurden die Bacillen (Schlangen-, Frosch-, Schildkrötenbacillen) auf Glycerinbouillon überimpft und 17 Tage bei Zimmertemperatur gehalten. Sie überwuchsen schnell die Bouillonoberfläche in zusammenhängenden Kolonien, die Schlangentuberkelbacillen in besonders dicken, üppigen, fettigen Rasen mit strahligen Falten und Runzeln. Die Tuberkuline werden dann nach der *Koch*schen Vorschrift durch Einengung des Nährbodens auf $^1/_{10}$ des ursprünglichen Volumens hergestellt. Neben diesen Kaltblüterbacillentuberkulinen verwandten wir humanes Tuberkulin — und zwar Cutituberkulin, wegen der besonders starken Hautreaktionen, die es hervorrufen soll — und in den Tierversuchen auch bovines Tuberkulin. Die Tuberkulinprüfung geschah durchweg *intracutan*, bei Kindern an der Beugefläche der Unterarme, bei Meerschweinchen an einer enthaarten Stelle des Bauches.

Die Tuberkulinverdünnungen wurden jedesmal frisch hergestellt. Es kamen bei Kindern Verdünnungen von 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000 zur Verwendung, also bei Injektion von $^1/_{10}$ ccm der Tuberkulinverdünnung Dosen von 1 mg, $^1/_{10}$ mg und $^1/_{100}$ mg Alttuberkulin. Die Meerschweinchen erhielten 0,04 g und 0,08 g. Wir machten uns für diese Dosen die Erfahrungen von *B.* und *E. Lange* zunutze, nach denen geringere Tuberkulinmengen bei Meerschweinchen keine oder nur atypische positive Reaktionen hervorrufen. Kranke Kinder wurden zu den Versuchen nicht herangezogen, nur Rekonvaleszenten nach solchen Krankheiten, die im allgemeinen die Tuberkulinreaktion nicht beeinträchtigen. Alle Kinder befanden sich in stationärer klinischer Behandlung. Kontrollprüfungen mit allen Tuberkulinen wurden an unvorbehandelten Kindern und Tieren angestellt, um etwaige Reaktionen am normalen, nicht umgestimmten Körper auszuschließen, ferner Intracutaninjektionen von physiologischer Kochsalzlösung angeschlossen.

---

Schildkrötenbacillen entstammten einer Ampulle des Seruminstituts in Oelzschau mit der Aufschrift: Friedr. Franz, Friedmannsches Tuberkuloseheil- und -schutzmittel. Starke Emulsion. Sie waren von mir überimpft und weiter gezüchtet worden.



Die Versuche gliederten sich in 3 Reihen:

1. Tuberkulosefreie, tuberkulinnegative Individuen wurden ohne Vorbehandlung mit Schlangen-, Frosch- und Schildkrötenbacillen-tuberkulin sowie mit humanem und bovinem Tuberkulin und physiologischer Kochsalzlösung intracutan gespritzt.

2. Tuberkulinnegative Individuen wurden in verschiedenen Gruppen:

a) mit Schlangentuberkelbacillen,
b) „ Froschtuberkelbacillen,
c) „ Schildkrötentuberkelbacillen,
d) „ Trompetenbacillen

vorbehandelt und nach 2 bzw. 3, 4 Wochen jedes mit den unter 1. genannten Tuberkulinen intracutan geprüft.

3. Tuberkulöse Individuen werden in gleicher Weise mit allen Tuberkulinen geprüft[1]).

Bedeutung der Abkürzungen:

TSchl = Schlangenbacillentuberkulin;
TFr = Froschbacillentuberkulin;
TSchi = Schildkrötenbacillentuberkulin;
TCuti = Cutituberkulin;
Tbov = Bovines Tuberkulin;
r = geringe Rötung;
R = starke Rötung;
i = geringe Infiltration;
I = starke Infiltration;
sc = subcutan;
iglt = intraglutäal;
+ = atypische positive Reaktion (*Römer*), Rötung von mindestens 5 : 5 mm Durchmesser ohne Infiltration;
++ = typische positive Reaktion, Rötung und Infiltration von mindestens 5 : 5 mm Durchmesser;
+++ = Kokardreaktion, breit aufsitzende starke Infiltration von einem flachen roten Hof umgeben.

In den Tabellen sind die nach 24 und 48 Stunden abgelesenen Intracutanreaktionen angegeben[2]).

[1]) Die Versuche der Reihe III waren schon unternommen und zum großen Teil abgeschlossen, als die Veröffentlichung von *B.* und *E. Lange* (Dtsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 8) über ähnliche Versuche und, wie ich vorwegnehmen will, mit ähnlichen Resultaten erschien. Ich teile trotzdem die Protokolle und Ergebnisse mit, weil eine Bestätigung ja nur erwünscht sein kann.

[2]) Es sind der Raumersparnis wegen nicht alle Tabellen veröffentlicht, sondern von jeder Versuchsreihe nur eine, um genaue Angaben über den Grad der Reaktionen machen zu können.



*Tabelle I.* I. Reihe.

1. Tuberkulinnegative Kinder mit Kaltblüterbacillentuberkulinen und mit humanem Tuberkulin geprüft.

| Nr. | Name und Alter | Intracutanimpfungen mit TSchi 0,001 g | TSchl 0,001 g | TFr 0,001 g | TCuti 0,001 g | Physiol. NaCl-Lös. | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Gerhard Sto. $2^1/_2$ J. | — | — | — | — | — | |
| 2 | Kurt R., $2^1/_3$ J. | — | — | — | — | — | |
| 3 | Alfred K. | — | — | — | — | — | |
| 4 | Hans H., 2 J. | Nach 48 Std. + r 5:5 mm nach 72 Std. — | — | — | Nach 48 Std. + r 5:5 mm nach 72 Std. — | — | War erkrankt an Influenza m. Pneumonie |

2. Unvorbehandelte Meerschweinchen mit Kaltblüter-Cuti- und Rinderbacillentuberkulinen geprüft.

| Nr. | | Intracutanimpfungen mit TSchi 0,04 g | TSchl 0,04 g | TFr 0,04 g | TCuti 0,04 g | Tbov. 0,04 g | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 a | — | — | — | — | — | — | — |
| 2 a | — | — | — | — | — | — | — |
| 3 a | — | — | — | — | — | — | — |
| 4 a | — | — | — | — | — | — | — |
| 5 a | — | — | — | — | — | — | — |

*Epikrise*: Die als Vorversuch aufzufassende I. Versuchsreihe hatte ein einheitliches Ergebnis: *Kaltblüter- wie Warmblüterbacillentuberkuline konnten im unvorbehandelten, nicht umgestimmten Organismus keine Reaktionen hervorrufen.* Die eine (teilweise) Ausnahme (Hans H.) findet eine einfache Erklärung. Das Kind war mit einer Influenzapneumonie eingeliefert und während des akuten Krankheitsstadiums anergisch, daher tuberkulinnegativ. (Die Influenza kann in manchen Fällen ähnlich den Masern eine positive Tuberkulinempfindlichkeit vorübergehend zum Erlöschen bringen.) Nach seiner Genesung erwies sich das Kind als schwach allergisch für humanes und Schildkrötenbacillentuberkulin. Es mußte also vorher durch den humanen Tuberkelbacillus umgestimmt sein. Die gleichzeitige Reaktion auf Schildkrötenbacillentuberkulin und nur auf dieses bei mangelnder Anspruchsfähigkeit auf die anderen Tuberkuline deutet aber auf eine nähere Verwandtschaft des Friedmannbacillus mit dem humanen Bacillus als der anderen Kaltblüterbacillen mit dem Typus humanus.

*Tabelle II.* II. Reihe. 1. Tuberkulinnegative Kinder vorbehandelt mit Schlangentuberkelbacillen.

| Nr. | Name und Alter | 1 mg Schl. tbc. bac. iglt. am | Intracutanimpfungen am | TSchl 0,001 g | TSchi 0,001 g | TFr 0,001 g | TCuti 0,001 g | Physiol. NaCl-Lösung | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 | Margarete G. $2^1/_4$ J. | 4. IV. 1922 | 28. IV. 1922 | +++ R+I 12:10 mm 14:10 mm | +++ R+I 18:15 mm 15:10 mm | + r+i 5:5 mm 5:5 mm | r 5:3 mm | — | Am 5. IV. erbsengroßes Infiltrat an der Injektionsstelle der Schl. tbc. bac. Am 12. IV. Gesäßhälfte geschwollen. Um die Einstichstelle Rötung von 10:50 cm. Am 20. IV. wieder normal. |
| 6 | Luise Sch. 2 J. | 4. IV. 1922 | 28. IV. 1922 | ++ R+i 17:50 mm 15:50 mm | ++ R+i 25:50 mm 25:50 mm | + r+i 5:5 mm | r 5:3 mm | — | Vom 6. IV.—20. IV. Schwellung und Rötung um die Injektionsstelle der Schl. tbc. bac. |
| 7 | Hedwig H. $1^1/_2$ J. | 4. IV. 1922 | 3. V. 1922 | + r 5:5 mm | ++ R+i 10:10 mm r+i 10:10 mm | — | — | — | Zur Zeit der Intracutanimpfungen erkrankt an Influenza. |
| 8 | Peter K. | 4. IV. 1922 | 28. IV. 1922 | +++ R+I 25:20 mm | +++ R+I 30:20 mm | ++ r+i 10:10 mm | — | — | — |

2. Meerschweinchen vorbehandelt mit Schlangentuberkelbacillen.

| Nr. | Gewicht g | 0,5 mg Schl. tbc. bac. sc. am | Intracutanimpfungen am | TSchl 0,04 g | TSchi 0,04 g | TFr 0,04 g | TCuti 0,04 g | Tbov 0,04 g | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 a | 350 | 14. III. 1922 | 28. III. 1922 | ++ r+i | — | — | — | — | — |
| 7 a | 270 | 14. III. 1922 | 28. III. 1922 | ++ r+i | — | — | — | — | — |
| 8 a | 320 | 14. III. 1922 | 6. IV. 1922 | 0,08 g — | 0,08 g — | 0,08 g — | 0,08 g — | 0,08 g — | — — |
| 9 a | 370 | 14. III. 1922 | 5. IV. 1922 | ++ R+I | — | — | — | — | — |

*Epikrise: Schlangentuberkelbacillen können den menschlichen und tierischen Körper selbständig umstimmen, so daß er mit dem Tuberkulin* des zur Vorbehandlung verwandten Stammes eine Tuberkulinlokalreaktion eingeht, also schon auf den flüchtigen Tuberkulinreiz neues spezifisches Gewebe bildet. Sie können ferner den menschlichen Körper *auch für die Tuberkuline anderer Kaltblüterstämme überempfindlich machen, nicht aber für humanes Tuberkulin,* denn die atypisch positiven Reaktionen (Rötung ohne Infiltration von nur 24stündiger Dauer) können nicht als echte Tuberkulinreaktionen angesehen werden. Immerhin zeugen die Reaktionen gegenüber dem völlig negativen Ausfall der Reaktionen bei unvorbehandelten Kindern für eine gewisse erworbene Empfindlichkeit, die sich auch bei der Vorbehandlung mit Frosch- und Schildkrötenbacillen (s. dort) wiederholt.

*Tabelle III.* II. Reihe.

3. Tuberkulinnegative Kinder vorbehandelt mit Froschtuberkelbacillen.

| Nr. | Name und Alter | 1 mg Frosch-tuber-kelbac. iglt. am | Intracutanimpfungen am | TFr 0,001 g | TSchl 0,001 g | TSchi 0,001 g | TCuti 0,001 g | Physiol. NaCl-Lös. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 9 | Lena. A., 1 J. | 17. IV. 1922 | 3. V. 1922 | + + r + i 5 : 5 mm 5 : 5 mm | — | + r 5 : 5 mm 5 : 5 mm | — | — |
| 10 | Anton, L., $1^3/_4$ J. | 17. IV. 1922 | 28. IV. 1922 | + + r + i 5 : 5 mm 5 : 5 mm | + + r + i 5 : 5 mm 5 : 5 mm | + + r + i 6 : 5 mm 6 : 5 mm | 3 : 2 mm | — |

4. Meerschweinchen vorbehandelt mit Froschtuberkelbacillen.

| Nr. | Gewicht | 0,5 mg Froschtuberkel-bacillen sc. am | Intracutanimpfungen am | TFr 0,04 g | TSchl 0,04 g | TSchi 0,04 g | TCuti 0,04 g | Thov 0,04 g |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10a | 290 g | 14. III. 1922 | 28. III. 1922 | + + R + I mit zentralerNekrose | r | r | — | — |
| 11a | 340 g | 14. III. 1922 | 28. III. 1922 | + + R + I | — | — | — | |
| 12a | 310 g | 14. III. 1922 | 28. III. 1922 | 0,08 g + + R + i | 0,08 g — | 0,08 g — | 0,08 g — | 0,08 g — |
| 13a | 350 g | 14. III. 1922 | 5. IV. 1922 | + + R + i | — | — | — | |
| 14a | 350 g | 14. III. 1922 | 5. IV. 1922 | + + R + I | — | — | — | |

*Epikrise: Froschtuberkelbacillen haben ebenfalls selbständige antigene Fähigkeiten,* sie rufen im Warmblüterorganismus eine Umstimmung hervor, die beim Menschen wiederum nicht nur eine Reaktion mit





Froschbacillentuberkulin, sondern auch mit Schlangen- und Schildkrötenbacillentuberkulin zuläßt. Für Warmblüterbacillentuberkulin können auch die Froschbacillen nicht ausreichend überempfindlich machen.

*Tabelle IV.* II. Reihe.

5. Tuberkulinnegative Kinder vorbehandelt mit Schildkrötentuberkelbacillen.

| Nr. | Name und Alter | 1 mg Schild-kr.-Tbc.-Bac. iglt. am | Intracutanimpfungen | | | | | | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Am | TSchi 0,001 g | TSchl 0,001 g | TFr 0,001 g | TCuti 0,001 g | Phys. NaCl | |
| 11 | Anny G.<br>13 Mon. | 17. IV.<br>1922 | 3. V.<br>1922 | ++<br>R+I 18:15 mm<br>r+i 6:5 mm | +<br>r 5:5 mm | +<br>r 5:5 mm | — | — | |
| 12 | Lieselotte<br>G. 3 3/4 J. | 17. IV.<br>1922 | 3. V.<br>1922 | ++<br>R+I 17:15 mm<br>r+i 7:5 mm | ++<br>R+i 7:5 mm<br>r+i 5:5 mm | ++<br>r+i 5:5 mm<br>5:5 mm | +<br>r 5:5 mm | — | |
| 13 | Hermann<br>B. 2 1/2 J. | 17. IV.<br>1922 | 3. V.<br>1922 | +++<br>R+I 25:15 mm<br>30:15 mm | +++<br>R+I 10:5 mm<br>15:10 mm | +++<br>R+I 20:20 mm<br>20:20 mm | +<br>R 8:6 mm<br>r 6:5 mm | — | Siehe Abb. |
| 14 | Irmgard<br>B. 2 J. | 17. IV.<br>1922 | 3. V.<br>1922 | ++<br>r+i 5:5 mm<br>5:5 mm | — | — | — | — | |

6. Meerschweinchen vorbehandelt mit Schildkrötentuberkelbacillen.

| Nr. | Gewicht g | 0,5 mg Schild-kr.-Tbc.-Bac. sc. am | Intracutanimpfungen | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Am | TSchi 0,08 g | TSchl 0,08 g | TFr 0,08 g | TCuti 0,08 g | Tbov 0,08 g |
| 15a | 780 | 19. III.<br>1922 | 6. IV.<br>1922 | ++<br>r+I<br>linsengroß | +<br>r (zent. Nekrose<br>an d. Inj.-Stelle) | — | — | · |
| 16a | 740 | 19. III.<br>1922 | 6. IV.<br>1922 | +<br>I linsengroß | I linsengroß | — | — | · |
| 17a | 400 | 19. III.<br>1922 | 9. IV.<br>1922 | ++<br>I+R | — | ++<br>i+r | — | — |
| 18a | 540 | 19. III.<br>1922 | 9. IV.<br>1922 | ++<br>i+r | ++<br>i+r | — | · | — |
| 19a | 340 | 19. III.<br>1922 | 9. IV.<br>1922 | ++<br>i+R | — | — | — | — |

7. Meerschweinchen vorbehandelt mit Trompetenbacillen.

| Nr. | Gewicht g | 0,5 mg Tromp.-Bac. sc. am | Intracutanimpfungen | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Am | TSchi 0,08 g | TSchl 0,08 g | TFr 0,08 g | TCuti 0,08 g | Tbov 0,08 g |
| 20a | 230 | 12. IV.<br>1922 | 29. IV.<br>1922 | ++<br>r+i | ++<br>R+i | — | ++<br>r+i | — |
| 21a | 400 | 12. IV.<br>1922 | 29. IV.<br>1922 | ++<br>R+i (Nekrose) | ++<br>r+i | ++<br>r+i | — | — |



*Epikrise: Vorbehandlung mit Schildkrötentuberkelbacillen ruft eine Umstimmung des menschlichen und tierischen Körpers für das Tuberkulin des eigenen Stammes sowie für Tuberkuline von Schlangen- und Froschtuberkelbacillen hervor.* In einem Falle — bei einem stark überempfindlichen Kinde — konnten die Schildkrötenbacillen auch eine Überempfindlichkeit für den humanen Bacillus, kenntlich an einer typischen, wenn auch schwach positiven Reaktion, bewirken (Abb. 1).

Trompetenbacillen zeigten im Meerschweinchenversuch eine recht bedeutende Fähigkeit zur Umstimmung für die verschiedenen Tuberkuline.



Abb. 1. Intracutanreaktionen nach Vorbehandlung mit Schildkrötentuberkelbacillen.
Rechts oben: Reaktion auf Schildkrötenbacillentuberkulin.
Rechts unten: „ „ Schlangenbacillentuberkulin.
Links oben: „ „ Froschbacillentuberkulin.
Links Mitte: „ „ Cutibacillentuberkulin.
Links unten: „ „ physiol. NaCl-Lösung.

Vergleicht man die biologische Kraft der Schlangen-, Frosch-, Schildkröten- und Trompetenbacillen nach dem Ausfall der Tuberkulinreaktionen, so erweisen sich *die Trompeten- und Schildkrötenbacillen als die aktivsten.* Sie konnten die Meerschweinchen zur Reaktion mit den Tuberkulinen der anderen Kaltblüterbacillen bringen, während die Frosch- und Schlangenbacillen streng einseitig für das eigene Tuberkulin sensibilisierten. Der Trompetenbacillus konnte ferner *ein Meerschweinchen auch für das Tuberkulin des humanen Bacillus überempfindlich machen,* und der Schildkrötenbacillus hatte, wenn auch nur in einem Falle, *einen menschlichen Körper mit umgestimmt für das Tuberkulin des humanen Bacillus.* Aus dem vereinzelten Fall dürfen keine Allgemeinschlüsse gezogen werden, immerhin hat ein positiver Ausfall die größere Be-

weiskraft gegenüber dem negativen. *Das Tuberkulin des Friedmann-bacillus war das wirksamste.* Die von ihm hervorgerufenen Reaktionen waren stärker infiltriert und der Fläche nach ausgedehnter, blieben daher auch länger bestehen als die anderen Reaktionen, und — was dem Bacillus eine Ausnahmestellung gab —, die stärkeren Tuberkulinreaktionen traten nicht nur nach Vorbehandlung mit dem eigenen Stamm, sondern auch nach der Vorinjektion von Frosch- und Schlangentuberkelbacillen auf.

Im übrigen zeigten die einzelnen Tuberkulinreaktionen gewisse qualitative Unterschiede. Das *Froschbacillentuberkulin rief flachere Infiltrate her-*

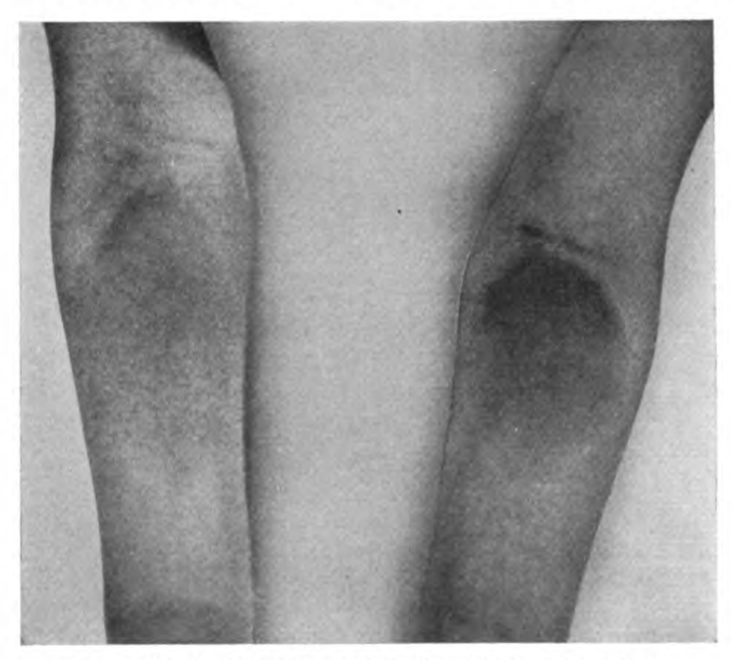


Abb. 2. Intracutanreaktionen bei einem tuberkulösen Kinde.
Rechts oben: Reaktion auf Schlangenbacillentuberkulin.
Rechts unten: „ „ Schildkrötenbacillentuberkulin.
Links oben: „ „ Froschbacillentuberkulin.
Links unten: „ „ physiol. NaCl-Lösung.

*vor, diese waren aber intensiver rot, meist auch ausgedehnter als die Schlangenbacillenreaktionen* (Abb. 2) und verschwanden im allgemeinen schneller als diese; eine Kokardreaktion trat an der Injektionsstelle des Froschbacillentuberkulins nur einmal auf. Im Vergleich mit den Alttuberkulinreaktionen waren die Reaktionen der Kaltblüterbacillentuberkuline meist schneller abgeblaßt, die Infiltrate schneller zurückgebildet; einzelne intensive Reaktionen hielten sich aber auch 14 Tage und länger und wiesen alle Merkmale einer heftigen spezifischen Entzündung auf: Starke Rötung und Infiltration, Hämorrhagien, Nekrose der oberen Hautschichten, dann bräunlich grüne Verfärbung, Abschilferung, endlich Rückbildung ohne Narbenbildung. Häufig war die Reaktion nach 48 Stunden weit intensiver als nach 24 Stunden.

*Tabelle V.* III. Reihe.

1. Tuberkulöse Kinder geimpft mit Kaltblüterbacillentuberkulinen.

| Nr. | Name und Alter | Krankheits-erscheinungen | Intracutanimpfungen | | | | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | TSchl 0,001 g | TSchl 0,001 g | TFr 0,001 g | Physiol. NaCl-Lösung | |
| 15 | Alfred L. 9 J. | Fungus genu. | ++ r+i 8:5 mm r 6:5 mm | + r 5:5 mm 5:5 mm | + r 5:5 mm 5:5 mm | — | Nach Tuberkulinkur hypergisch Wildbolz —. |
| 16 | Käte H. 9 J. | Pleuritis tbc. | +++ R+I 90:60 mm 80:64 mm (gemeinsam) | +++ | +++ R+I 70:60 mm 60:40 mm | + r 6:8 mm — | Reaktionen 10—14 Tage lang sichtbar. |
| 17 | Maria W. 11 J. | Lungentbc. mit Kavernen | ++ R+I 25:20 mm 10: 5 mm | +++ R+I 45:30 mm 40:32 mm | ++ r+i 25:15 mm 5: 5 mm | r 7:8 mm — | Physiol, NaCl-Reaktion nur nach 24 Std. Rötung, nach 48 Std. normal. |
| 18 | Erna Sch. 8 J. | Lungentbc. | +++ R+I 25:15 mm 25: 5 mm | +++ R+I 32:25 mm 30:25 mm | +++ R+I 42:22 mm 43:40 mm | — | — |
| 19 | Elisabeth D. 14 J. | Lungentbc. | ++ R+i 25:15 mm 35:25 mm | ++ R+I 32:25 mm 30:25 mm | +++ R+I 20:20 mm 20:20 mm | — | |
| 20 | Heinrich G. $12^1/_2$ J. | Lungentbc. mit Kavernen | +++ 25:15 mm R+I 65:35 mm (gemeinsam) | +++ 40:40 mm | + r+i 30:25 mm 30:20 mm | — r 6:4 mm | — Wie Nr. 17. |
| 21 | Helmuth H. 9 J. | Positive Tuberkulin-reaktion | +++ R+I 25:15 mm 25:20 mm | ++ R+i 30:20 mm 30:25 mm | + r 25:15 mm 25:20 mm | — | — |
| 22 | Wilhelmine M. 10 J. | Haut- und Knochentbc. | +++ R+I 30:13 mm 30:10 mm | +++ R+I 35:30 mm 35:30 mm | +++ R+I 42:35 mm 40:30 mm | — | |
| 23 | Karl W. | Lungentbc. | +++ R+I 20:20 mm | +++ R+I 30:25 mm | + r 15:10 mm | | — |

2. Tuberkulöse Kinder geimpft mit Kaltblüterbacillentuberkulinen.

| Nr. | Name und Alter | Krankheits-erscheinungen | Intracutanimpfungen | | | | | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | TSchi 0,0001 g | TSchl 0,0001 g | TrFr 0,0001 g | TCuti 0,0001 g | Physiol. NaCl | |
| 24 | Maria W. 11 J. | Lungentbc. | ++<br>R+i 20:20 mm<br>r+i 30:20 mm | ++<br>R+i 40:40 mm<br>r+i 40:30 mm | +<br>r 20:15 mm<br>20:20 mm | +++<br>R+i<br>20:20 mm<br>5:5 mm | r<br>5:5 mm | — |
| 25 | Elisabeth Sch. 8 J. | Halsdrüsen-, Hilusdrüsen-, Lungentbc. | +++<br>R+I 20:20 mm<br>20:25 mm | +++<br>R+I 25:20 mm<br>30:30 mm | +++<br>R+I 30:30 mm<br>30:30 mm | +++<br>R+I<br>40:30 mm<br>60:50 mm | — | Reaktionen 10—13 Tage sichtbar |
| 26 | Anna P. 8 J. | Pleuritis tbc. | ++<br>r+i 10:10 mm<br>15:15 mm | +<br>R 25:25 mm<br>30:25 mm | +<br>r 5:5 mm<br>8:5 mm | ++<br>R+i<br>25:20 mm<br>20:15 mm | — | — |

3. Tuberkulöse Kinder geimpft mit Kaltblüterbacillentuberkulinen.

| Nr. | Name und Alter | Krankheits-erscheinungen | Intracutanimpfungen | | | | | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | TSchi 0,00001 g | TSchl 0,00001 g | TFr 0,00001 g | TCuti 0,00001 g | Phys. NaCl | |
| 27 | Cäcilie B. 8 J. | Coxitis tbc. | +++<br>R+I 40:30 mm<br>r+I 35:30 mm | ++<br>R+i 10:10 mm<br>10:10 mm | ++<br>R+i 20:10 mm<br>r+i 15:10 mm | +++<br>R+I<br>15:10 mm<br>15:10 mm | — | Reaktionen 6, 8, 12 Tage sichtbar. |
| 28 | Elisabeth L. 6 J. | Pleuritis tbc. | +++<br>R+I 30:20 mm<br>15:15 mm | ++<br>r+i 15:15 mm<br>10:15 mm | +<br>r 10:10 mm<br>15:15 mm | +++<br>R+I<br>20:20 mm<br>20:15 mm | | Reaktionen 8 Tage sichtbar. |
| 29 | Gertrud J. 7 J. | Coxitis, Spondylitis tbc. | ++<br>r+i 10:10 mm<br>5:5 mm | ++<br>R+i 25:15 mm<br>r+i 20:10 mm | ++<br>R+i 30:30 mm<br>35:30 mm | ++<br>r+i<br>15:15 mm<br>15:15 mm | — | Reaktionen 6 Tage sichtbar. |



*Epikrise:* Tuberkulöse Kinder mit den verschiedensten tuberkulösen Krankheitserscheinungen, mit Haut-, Drüsen-, Knochen-, Gelenk-, Serosa-, Lungentuberkulose reagierten ausnahmslos auf die intracutane Injektion von 1 mg, $^1/_{10}$ mg und $^1/_{100}$ mg Kaltblüterbacillentuberkulin positiv. Der Grad der Reaktionen war naturgemäß bestimmt von der Anspruchsfähigkeit der tuberkulösen Organismen. Der Art nach wiesen die Reaktionen die charakteristischen Unterschiede zwischen Frosch- und Schlangenbacillentuberkulinen auf. Qualitive und quantitative Besonderheiten der Schildkrötenbacillenreaktionen waren nicht zu erkennen.

*Tabelle VI.* III. Reihe.

4. Meerschweinchen mit humanen Tuberkelbacillen infiziert, nach 15 Tagen mit Kaltblüterbacillentuberkulinen geimpft.

| Nr. | Gewicht g | Intracutanimpfungen TCuti 0,04 g | TSchi 0,04 g | TSchl 0,04 g | TFr 0,04 g | Tbov 0,04 g | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 22a | 400 | · | · | ++<br>I+r | — | · | · |
| 23a | 320 | +<br>R mit zentraler Nekrose | | · | · | · | 24 Std. nach d. Impfg. † Tuberkulintod. |
| 24a | 275 | · | · | ++<br>R+I erbsengroß | —<br>r+i erbsengroß 2 pfenniggroß | · | · |
| 25a | 300 | ++<br>R+I knapp bohnengroß | · | ++<br>R+I mit Nekrose erbsengroß | · | · | · |

| Nr. | Gewicht g | Intracutanimpfungen nach 18 Tagen TCuti 0,08 g | TSchi 0,08 g | TSchl 0,08 g | TFr 0,08 g | Tbov 0,08 g | Bemerkungen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 26a | 320 | — | | ++<br>i+r linsengroß | — | · | · |
| 27a | 320 | — | — | — | i halblinsengroß | · | · |
| 28a | 360 | | — | +<br>i+r halblinsengroß | — | · | · |
| 29a | 320 | +<br>I linsengroß | +<br>i+r | +<br>i+r linsengroß zentr. Nekrose | · | · | · |
| | | Intracutanimpfungen nach 27 Tagen | | | | | |
| 30a | 320 | · | +<br>I linsengroß | +<br>I linsengroß | ++<br>i+r linsengroß | +<br>I linsengr. | · |
| 31a | 320 | · | +<br>I linsengroß | +<br>i+R | +<br>i+R | +<br>R+I linsengr. | · |
| 32a | 360 | · | | — | — | — | *) |

*) 2 Tage nach der Impfung †. An den Impfstellen von Tbov, TSchi und TSchl im Unterhautbindegewebe Hämorrhagien.



*Epikrise:* Tuberkuloseinfizierte Meerschweinchen wurden durch den humanen Bacillus nicht einseitig für humanes Tuberkulin sensibilisiert, sondern gingen auch mit den Tuberkulinen der Schildkröten-, Schlangen-, Frosch-, Rinderbacillen Reaktionen ein, allerdings weit zögernder und unregelmäßiger als die tuberkulösen Kinder.

## *Zusammenfassung.*

Die selbständige, spezifisch gewebsumstimmende Fähigkeit verschiedener Kaltblütertuberkelbacillen wurde in mehreren Versuchsreihen an Kindern und Meerschweinchen mittels der intracutanen Tuberkulinreaktion geprüft.

1. Schildkröten-, Schlangen-, Frosch- (und Trompeten-) Bacillen konnten den Warmblüterorganismus so umstimmen, daß er mit dem Tuberkulin des zur Vorbehandlung verwandten Stammes eine spezifische Lokalreaktion gab. Nicht vorbehandelte Individuen reagierten auf die Intracutaninjektionen der Tuberkuline nicht. Kontrollprüfungen mit physiologischer Kochsalzlösung [auch mit Serum und Milch[1])] gaben keine Reaktionen.

2. Der menschliche Körper ging nach Vorbehandlung mit einem Stamm auch mit den Tuberkulinen der anderen Kaltblüterbacillenstämme eine Lokalreaktion ein, nicht dagegen — oder nur in einem Ausnahmefall — mit dem Tuberkulin des humanen Bacillus. Es besteht also eine nahe Verwandtschaft der Kaltblüterbacillen untereinander, und zwar eine weit nähere als mit dem humanen Bacillus. Der menschliche Körper erweist sich als reaktionsfähiger als der tierische.

3. Die einzelnen Reaktionen zeigten bei gleicher Dosierung gewisse qualitative und quantitative Unterschiede. Die Lokalreaktionen der Froschtuberkelbacillen waren flacher und intensiver rot, die der Schildkrötenbacillen stärker infiltriert, ausgedehnter und blieben länger bestehen als die Vergleichsreaktionen.

4. Die Schildkröten- und Trompetenbacillen waren die biologisch aktivsten, und wenn auch den Kaltblüterbacillen näher verwandt als dem humanen Bacillus, so doch imstande, mit dem humanen Bacillus und seinen Produkten zur Erzeugung einer Lokalreaktion in Wechselwirkung zu treten. Die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen dem Schildkrötenbacillus und dem humanen Bacillus zeigen sich also nicht einseitig in der Reaktion: humaner Bacillus und Kaltblüterbacillentuberkulin, sondern können auch durch die Umkehrung der Reaktion: Kaltblüterbacillus und humanes Tuberkulin, wenn auch vielleicht nur in Ausnahmefällen, zum Ausdruck kommen.

5. Tuberkulöse Kinder und tuberkuloseinfizierte Meerschweinchen reagierten auf die Injektion sämtlicher Tuberkuline positiv. Bei diesen

[1]) In anderen Versuchsreihen geprüft.





Lokalreaktionen zeigte sich keine Bevorzugung des Friedmannbacillus, keine nähere Verwandtschaft mit dem humanen Bacillus, als sie den anderen Kaltblüterbacillen zukommt. Die stärkste gewebsumstimmende Kraft bewies der humane Bacillus.

---

## Literaturverzeichnis.

*Bessau*, Moderne Tuberkuloseprobleme. Vortrag im ärztlichen Verein Marburg, 11. I. 1922. — *Dietrich*, Dtsch. med. Wochenschr. 1921, S. 406. — *Heimbüchel, W.*, Diss. Vet.-med. Fakult. Gießen 1922. — *Hoffmann, A.*, Diss. Bonn 1922. — *B.* und *E. Lange*, Dtsch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 8. — *Lange, B.*, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 28. — *Lange, Ludwig*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap., Orig. **32**, H. 3/4. 1921. — *Meyer, S.*, Monatsschr. f. Kinderheilk., Orig. 1921, H. 5. — *Möller, A.*, Zeitschr. f. Tuberkul. **5**, 206. 1904; Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 6. — *Selter, H.*, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 24. — *Severin*, Diss. Köln 1921. — *Sons* und *v. Miculicz-Radecki*, Dtsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 26, S. 735. — *Thomashoff, E.*, Diss. Vet.-med. Fakult. Gießen 1922. — *Uhlenhuth* und *Lange*, Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 51.

(Aus der Seuchenabteilung des Instituts für Infektionskrankheiten „Robert Koch“ in Berlin [Leiter: Dr. *A. Schnabel*].)

# Experimentelle Untersuchungen zum Wesen der Weil-Felixschen Reaktion.

Von
**T. Hishikawa.**

Die Fleckfieberforschung der letzten Jahre war bestrebt, in doppelter Hinsicht Fortschritte zu erzielen, einerseits in der Richtung der Auffindung des Erregers des Fleckfiebers, andererseits hinsichtlich der Erzielung eines praktisch brauchbaren Verfahrens zur Diagnosestellung auf einem anderen Wege als auf Grund der klinischen Erscheinungen allein. Während die ätiologische Forschung, als deren wichtigstes Ergebnis die Feststellung der innigen Beziehungen zwischen der *Rickettsia Prowazeki* und dem Fleckfieber anzusehen ist, sich noch im Stadium der Entwicklung befindet, hat die Suche nach einem praktisch anwendbaren diagnostischen Verfahren durch die Auffindung der *Weil-Felix*schen Reaktion einen gewissen, wenn auch vorläufigen Abschluß gefunden.

Als *Weil-Felix*sche Reaktion bezeichnet man bekanntlich die Erscheinung, daß das Serum von Fleckfieberkranken oder Rekonvaleszenten die Fähigkeit besitzt, die der Proteusgruppe angehörenden $X_{19}$-Bacillen in relativ hohen Verdünnungen zu agglutinieren. Diese Erscheinung hat bisher eine sehr umfangreiche Bearbeitung erfahren, ohne daß für ihr Wesen eine befriedigende Erklärung gefunden werden konnte. Denn die scheinbar selbstverständliche Schlußfolgerung, daß die *Weil-Felix*sche Reaktion die Folge einer Infektion mit $X_{19}$-Bacillen sei und daß das Fleckfieber also durch diesen Bacillus hervorgerufen werde, erwies sich nicht als stichhaltig.

Nur wenige Autoren (*Weil* und *Felix*, *Zlocisti*, *Friedberger*) nehmen an, daß die $X_{19}$-Bacillen für die Fleckfiebererkrankung eine ätiologische Bedeutung besitzen. Die überwiegende Zahl der Autoren mißt jedoch dieser Erscheinung in ätiologischer Beziehung keine besondere Bedeutung bei. Zu viele Gründe sprechen gegen die Auffassung der *Weil-Felix*schen Reaktion als Folgeerscheinung einer Infektion mit $X_{19}$-Bacillen. Der $X_{19}$-Bacillus wird nur äußerst selten bei Fleckfieberkranken gefunden; und irgendwelche besonderen Schlüsse aus dem Umstande zu ziehen, daß er bei dieser Erkrankung manchmal gefunden wird,



erscheint nicht angängig, da man mit ähnlichem Rechte die vielen anderen beim Fleckfieber gefundenen Bacillen als Erreger ansehen könnte. Wichtiger noch erscheint die Tatsache, daß das Fleckfieberserum nicht nur die $X_{19}$-Bacillen, sondern auch eine ganze Reihe anderer Bacillen zu agglutinieren vermag. So züchtete *Horiuschi* während des Russisch-Japanischen Krieges ein Bacterium, das er „Bacillus febris exanthematici Mandschurici" nannte, welches vom Serum Fleckfieberkranker agglutiniert wurde. Das im Jahre 1908 von diesem Autor beschriebene Stäbchen zeigt eine große Ähnlichkeit mit dem Paratyphusbacillus und unterscheidet sich von diesem durch die positive Indolreaktion. Der Agglutinationstiter des Krankenserums, der im Durchschnitt 1 : 100 bis 1 : 500 beträgt, zeigt während des Krankheitsverlaufs einen allmählichen Anstieg bis zu einem Maximum zu Beginn der Rekonvaleszenz, um dann langsam zu sinken, ein Verhalten also, wie es bei der *Weil-Felix*schen Reaktion zu konstatieren ist. 2 Jahre später teilte *Wilson* seine Befunde von grampositiven Diplokokken mit, die, aus dem Blute von Fleckfieberkranken gezüchtet, von Fleckfieberseren in einer Verdünnung 1 : 100 bis 1 : 500 agglutiniert wurden. Außerdem züchtete derselbe Autor aus dem Urin und den Faeces von Fleckfieberkranken einen coliähnlichen Bacillus, den er Bacillus „U" nannte und der sogar durch eine Verdünnung 1 : 1600 von Fleckfieberseren agglutiniert wurde. Da zwischen diesem „U"-Bacillus und den $X_{19}$-Bacillen von *Weil-Felix* innige Beziehungen zu bestehen scheinen, sah sich *Wilson* zuletzt veranlaßt, Prioritätsansprüche hinsichtlich der *Weil-Felix*schen Reaktion zu erheben. *M. Rabinowitsch* kultivierte aus dem Blute und Organen eine kleines, grampositives, unbewegliches Stäbchen, das vom Serum der Kranken kurz vor der Krisis und nach derselben agglutiniert wurde und welches beim Meerschweinchen eine, gegen nachträgliche Infektion mit Krankenblut immunisierende Erkrankung hervorzurufen vermochte. Das von *Fürth* und von *Müller* beschriebene Doppelstäbchen zeigt eine große Ähnlichkeit mit dem von *Rabinowitsch* angegebenen. *Predjetschensky* beschrieb im Jahre 1910 ein gramnegatives, unbewegliches, manchmal diplokokkenähnliches, bei Fleckfieber regelmäßig nachweisbares Stäbchen, das für Meerschweinchen und Kaninchen pathogen war und von Rekonvaleszentenserum in einer Verdünnung 1 : 40 agglutiniert wurde. Noch größeres Interesse beanspruchte der von *Plotz* im Jahre 1914 entdeckte Bacillus, der in 92% der Fälle vom Rekonvaleszentenserum agglutiniert wurde. Es handelt sich um ein pleomorphes, unbewegliches, grampositives, obligat anaerobes Stäbchen, das aus dem Blute fleckfieberkranker Menschen und experimentell infizierter Tiere gezüchtet werden konnte. Dieser *Plotz*sche Bacillus konnte auch während des Weltkrieges auf verschiedenen Kriegsschauplätzen von verschiedenen Autoren gezüchtet werden.



Als weiteres wichtiges Argument gegen die Annahme, daß die *Weil-Felix*sche Reaktion als eine Folge der Infektion mit $X_{19}$-Bacillen anzusehen sei, wäre anzuführen, daß es nicht gelingt, mit den $X_{19}$-Bacillen beim empfänglichen Versuchstier, insbesondere beim Meerschweinchen, jene Erkrankung hervorzurufen, die durch Injektion von Blut oder Organaufschwemmung fleckfieberkranker Menschen und Tiere mit Leichtigkeit hervorgerufen werden kann. Wohl ist der $X_{19}$-Bacillus für die Versuchstiere pathogen, jedoch unterscheidet sich die durch ihn bedingte Erkrankung ganz wesentlich von der echten Fleckfieberinfektion. Auf die in serologischer Hinsicht wichtigen Unterschiede soll weiter unten eingegangen werden.

Schließlich sei als mit der Annahme eines ätiologischen Zusammenhanges der *Weil-Felix*schen Reaktion mit dem $X_{19}$-Bacillus unvereinbar angeführt, daß es nur in ganz wenigen Fällen gelungen ist, die $X_{19}$-Bacillen aus der Laus, die für die Fleckfieberübertragung allein in Betracht kommt, zu züchten.

Bei diesem Sachverhalt blieb den Autoren nichts übrig, als theoretische Erklärungsversuche für das Auftreten der *Weil-Felix*schen Reaktion bei Fleckfieber heranzuziehen. Viele faßten die Reaktion als Paragglutination auf. Man versteht bekanntlich darunter die Erscheinung, daß z. B. die bei Ruhrkranken gezüchteten Colibacillen die Fähigkeit haben, nicht nur Agglutinine gegen Colibacillen, sondern auch solche gegen Ruhrbakterien zu binden (*Kuhn* und *Woithe*). Es wird angenommen, daß im gegebenen Beispiel die Colibacillen im Körper des Ruhrkranken gewisse Eigenschaften (Receptoren) der Dysenteriebacillen angenommen haben. In ähnlicher Weise würden also auch die $X_{19}$-Bacillen durch den Aufenthalt im Fleckfieberorganismus aus gewöhnlichen Proteusbacillen so entstanden sein, daß letztere die Eigenschaft angenommen haben, vom Fleckfieberserum agglutiniert zu werden (*Otto* und andere).

Zur Unterstützung dieser Annahme wird angeführt, daß es möglich ist, gewöhnlichen Proteusstämmen Parareceptoren für Fleckfieberagglutinine künstlich anzuzüchten. So hat *Oettinger* beobachtet, daß Proteuskulturen, die 3 Wochen auf mit defibriniertem Fleckfieberblut vermischtem Nähragar bzw. in Blutbouillon fortgezüchtet wurden, nach dieser Zeit von *einzelnen* Fleckfieberseren bis 1 : 100, zum Teil auch schwach bis 1 : 200, agglutiniert wurden. Auch *Papamarku*, der die Proteuskultur in Blutbouillon und in agglutininhaltiger Bouillon züchtete, gewann schwach agglutinable Stämme. Noch deutlichere Ergebnisse erzielte *Grütz* (zitiert bei *Otto*) in Versuchen, die er auf *Ottos* Veranlassung ausgeführt hat. Ein wichtiges Argument, das gegen die Auffassung der *Weil-Felix*schen Reaktion als Paragglutination angeführt wird, ist die Tatsache, daß die künstlich herbeigeführte Agglutinabilität der gewöhn-



lichen Proteusbacillen durch Fleckfiebersera nach einigen Wochen bis Monaten verloren geht, während die $X_{19}$-Bacillen diese Eigenschaft dauernd beibehalten. Nur *Mühlens* und *Stojanoff* haben mitgeteilt, daß ein aus der *Kral*schen Sammlung bezogener $X_{19}$-Stamm mit der Zeit seine Agglutinabilität verloren hat. Allerdings muß noch berücksichtigt werden, daß „in vivo eine noch wirksamere Beeinflussung der Proteusstämme stattfindet, als dies bisher im Reagensglas zu erreichen möglich war" (*Otto*). Als ein noch wichtigerer Einwand gegen die Paragglutinationstheorie wären Befunde anzusehen, aus denen hervorgeht, daß $X_{19}$-Bacillen auch bei Menschen zu finden sind, die niemals an Fleckfieber gelitten haben (*Wolf, Aoki* und *Kondo*).

Nicht viel stichhaltiger erscheint uns die Anschauung, daß normale, gegen besondere Proteusstämme zufällig gerichtete Agglutinine unter dem Einfluß der Fleckfieberinfektion eine starke Vermehrung erfahren (*Braun* und *Salomon*). Zur Unterstützung dieser Auffassung wird angeführt, daß auch schon normales Serum in großen Mengen $X_{19}$-Bacillen zu agglutinieren vermag, ferner daß die Thermolabilität, die eine Haupteigenschaft des Fleckfieberserums ist, sich vielfach auch bei normalen Agglutininen findet und daß schließlich die Fleckfiebererkrankung auch mit einer starken Vermehrung der Agglutinine gegen Typhusbacillen einhergehen kann.

Die Auffassung, daß die *Weil-Felix*sche Reaktion durch eine Mischinfektion der spezifischen Fleckfiebererkrankung mit $X_{19}$-Bacillen hervorgerufen wird, ist mit der bereits erwähnten Erfahrungstatsache unvereinbar, daß die $X_{19}$-Bacillen, deren Kultur sonst keine Schwierigkeiten bietet, bei Fleckfieberkranken äußerst selten gefunden werden.

Auch die Annahme einer polyagglutinatorischen, zum Teil durch eine besondere physikalisch-chemische Veränderung des Fleckfieberblutes bedingten Fähigkeit des Serums hielt den dagegen angeführten Argumenten nicht stand. Die polyagglutinatorische Eigenschaft des Fleckfieberserums verschiedenen Mikroorganismen gegenüber wurde bereits eingangs gestreift. Dazu kam noch die Erfahrung, daß manche Fleckfiebersera, mit destilliertem Wasser verdünnt, im Vergleich mit dem Verhalten normaler Sera eine besonders intensive Trübung zeigten (Trübungsreaktion nach *Weltmann*). Diese letztgenannte Reaktion tritt jedoch nicht in allen Fleckfieberfällen auf, ebensowenig wie die *Wassermann*sche Reaktion, die in manchen Fällen vorübergehend positiv wird. Die Erscheinung weist darauf hin, daß tatsächlich Veränderungen physikalisch-chemischer Natur eintreten, sie erklärt aber nicht die fast absolute Konstanz der *Weil-Felix*schen Reaktion beim Fleckfieber.

Viel plausibler erscheint uns die Annahme, daß die *Weil-Felix*sche Reaktion durch heterogenetische Antikörper bedingt sei (*Kolle* und *Schloßberger*). Diese Erscheinung gehört in der Immunitätslehre nicht

zu den Ausnahmen. So kann man z. B. mit Pferdeniere oder mit Meerschweinchenorganen hämolytische Sera gegen Hammelerythrocyten gewinnen oder mit einer gewissen Hefeart Agglutinine gegen Typhusbacillen erzeugen. Es könnte sich also auch beim Fleckfiebervirus um ein heterogenetisches Antigen handeln, welches entweder direkt die Agglutininbildung gegen $X_{19}$-Bacillen verursacht oder aber indirekt, indem unter dem Einflusse der Infektion mit dem noch unbekannten Erreger Receptoren abgestoßen würden, die auf die haptophoren Gruppen der $X_{19}$-Bacillen passen.

Für die letztgenannte Auffassung besitzen wir zwar keine direkten Anhaltspunkte außer den erwähnten Analogien bei anderen heterogenetischen Antigenen. Und dennoch möchten wir ihr eine ausschlaggebende Rolle beim Zustandekommen der *Weil-Felix*schen Reaktion zuweisen. Sie unterscheidet sich von den anderen Hypothesen ganz wesentlich: Es gibt kein stichhaltiges Argument, das gegen sie sprechen würde, wie das bei den anderen der Fall ist. Die Gegner dieser Hypothese sehen in dem Moment des „Zufalls" den Hauptgrund für deren Ablehnung.

In neuester Zeit hat die Frage nach dem Zustandekommen der *Weil-Felix*schen Reaktion im Verlaufe des Fleckfiebers durch Heranziehung des Tierexperimentes eine lebhafte Bearbeitung erfahren. Es lag ja nahe, zu untersuchen, ob ähnliche serologische Veränderungen auch bei den Versuchstieren nachzuweisen sind. Und da sich das Meerschweinchen als Versuchstier ersten Ranges erwiesen hat, wurden die ersten Agglutinationsversuche bei diesem Tier unternommen, allerdings ohne Erfolg. Denn das Blutserum der Meerschweinchen, welche an Fleckfieber in Gefolge der Infektion mit virushaltigem Material erkrankten oder welche Fleckfieber überstanden haben, vermochte nicht $X_{19}$-Bacillen zu agglutinieren. Nur vereinzelte Autoren sahen eine Andeutung einer Agglutination (*da Rocha Lima, Otto* und *Winkler*). Schon hier zeigte sich ein großer Widerspruch zwischen dieser negativen Reaktion des fleckfieberkranken Meerschweinchens und der Erfahrungstatsache, daß Meerschweinchen ziemlich leicht Agglutinine gegen $X_{19}$-Bacillen bilden, wenn man ihnen diese Bacillen parenteral einverleibt.

Erst später wurde das Kaninchen zu diesen Untersuchungen herangezogen. Dieses Tier ist für die Fleckfiebererkrankung nur wenig empfänglich, und nur die weitere Übertragung auf das empfindlichere Meerschweinchen war ein Beweis dafür, daß das Virus im Kaninchenorganismus fortlebte (*Doerr* und *Pick*, *Weil* und *Felix*). Und da auch das nicht immer gelang, so war vielfach nicht festzustellen, ob die Infektion angegangen ist oder nicht. Es erscheint daher begreiflich, daß man, abgesehen von Erwägungen theoretischer Natur, auch aus diesem Grunde aus den serologischen Veränderungen Anhaltspunkte für die stattgehabte Infektion des Kaninchens zu gewinnen suchte. Die ersten Untersucher

maßen den geringen Titersteigerungen des Kaninchenserums (bis 1 : 40) gegenüber $X_{19}$-Bacillen keine besondere Bedeutung bei und faßten die Ergebnisse als negativ auf (*Doerr* und *Pick*). Sie glaubten sich dazu um so eher berechtigt, als sie derartige geringe Titersteigerungen der Kaninchensera auch nach Vorbehandlung mit normalen, nicht virushaltigen Meerschweinchenorganen erhielten. Zu dieser Beurteilung mag auch der Umstand beigetragen haben, daß die *Weil-Felix*sche Reaktion beim Menschen bedeutend höhere Agglutinationstiter aufweist (bis 1 : 100 000). Auch *Russ* und *Kirschner* erhielten negative Resultate bei Anstellung der $X_{19}$-Agglutination mit dem Serum der mit Fleckfiebervirus injizierten Kaninchen. Im Gegensatz dazu berichten *Weil* und *Felix*, daß es ihnen gelungen sei, beim Kaninchen durch Infektion mit Fleckfieber regelmäßig Agglutinine gegen $X_{19}$-Bacillen zu erzeugen. In letzter Zeit haben auch *Otto* und *Winkler* über positive Resultate dieser Art berichtet. Allerdings waren die erzielten Agglutinintiter relativ niedrig (durchschnittlich 1 : 50 bis 1 : 100, ausnahmsweise 1 : 500 und 1 : 1000). *Otto* und *Winkler* werfen die Frage auf, ob nicht die geringe Virulenz mancher Fleckfieberpassagestämme die Ursache niedriger Agglutinationstiter beziehungsweise der negativen Resultate sei. *Weil* und *Felix* wollen mit normalen Meerschweinchenorganen niemals $X_{19}$-Agglutinine erzielt haben. Bemerkenswert und ebenfalls mit der Annahme der $X_{19}$-Bacillen als Fleckfiebererreger unvereinbar erscheint die Tatsache, daß das Kaninchen, welches auf die parenterale Einverleibung von $X_{19}$-Bacillen prompt mit hohen Agglutinintitern reagiert, wie das alle Autoren übereinstimmend berichten, bei der Infektion mit Blut oder Organen fleckfieberinfizierter Tiere oder Menschen nur wenig Agglutinine bildet. Auf die von *Weil* und *Felix* und von *Weil* und *Gruschka* dafür gegebene Erklärung soll weiter unten eingegangen werden.

Diese zwei Erscheinungen, das refraktäre Verhalten des Meerschweinchens in serologischer Beziehung einerseits und die strittigen Angaben über die serologischen Veränderungen im Kaninchenorganismus im Gefolge der Fleckfieberinfektion andererseits, schienen uns Grund genug, um die betreffenden Versuche unter variierten Bedingungen nochmals durchzuführen.

Den Ausgangsstamm für die Versuche am Meerschweinchen und Kaninchen bildete ein Fleckfiebervirus, welches durch Verimpfung von Patientenblut im Stadium des Fiebers auf Meerschweinchen, und zwar auf intraperitonealem und intrakardialem Wege gewonnen wurde. Dieser Versuch sei hier angeführt.

Die Meerschweinchen B 1 und B 2 erhalten je 2 ccm defibrinierten Blutes von Patienten A. L. am 4. Fiebertage intraperitoneal injiziert. Gleichzeitig erhalten zwei Meerschweinchen, B 3 und B 4, je 0,1 ccm desselben Blutes intrakardial. Die Meerschweinchen B 3 und B 4 zeigen nach











einer Inkubationszeit von 6 bzw. 9 Tagen einen plötzlichen Fieberanstieg auf 39°. Während das Meerschweinchen B 3 am dritten Fiebertage bei 40° C Körpertemperatur zur weiteren Übertragung getötet wird, zeigt das Meerschweinchen B 4 während insgesamt 9 Tagen eine Continua von durchschnittlich 39,5° C. Die Inkubationszeit der Meerschweinchen B 1 und B 2 betrug dagegen 13 bzw. 17 Tage; daran schloß sich ein deutliches, wenn auch nicht so regelmäßiges und kürzer dauerndes Fieber, und zwar betrug die Fieberdauer beim Meerschweinchen B 1 5 Tage und bei B 2 6 Tage. Vergleicht man die Fieberkurven miteinander, so kann es nicht entgehen, daß die Meerschweinchen, welche intrakardial gespritzt wurden, eine viel ausgesprochenere, gegen das fieberfreie Stadium sich viel schärfer absetzende Fieberbewegung als das intraperitoneal gespritzte zeigen. Auch erscheint die Inkubationszeit beim intrakardialen Applikationsmodus viel kürzer und weist darauf hin, daß bei der intraperitonealen Einverleibung von virushaltigem Blut das Virus entweder geschädigt wird oder sich weniger rasch vermehrt. Wir haben bei unseren weiteren Versuchen diese Übertragungsart beibehalten.

Das steril entnommene Gehirn von B 3 wird im sterilen Mörser fein verrieben, mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und davon ganz minimale Mengen zwei weiteren ungebrauchten Meerschweinchen B 5 und B 6 intrakardial eingespritzt. Die intrakardikale Injektion erfolgt mittels einer mit feiner Kanüle versehenen Rekordspritze, nachdem vorher die Haut über dem Herzen nach Entfernung der Haare mit Jodtinktur desinfiziert und eine kleine Blutmenge in die Spritze aspiriert worden war. Das Meerschweinchen B 5 beginnt nach 5 Tagen und das Meerschweinchen B 6 nach 6 Tagen zu fiebern. B 6 wird am 3. Fiebertage bei 40,2° Körpertemperatur zur weiteren Übertragung getötet, B 5 fiebert 8 Tage und wird dann zur Immunitätsprüfung belassen. Die histologische Untersuchung der Gehirne der im Fieberstadium getöteten Meerschweinchen ergibt die Anwesenheit mehr oder weniger zahlreicher für das Fleckfieber charakteristischer perivasculärer Infiltrate, der sogenannten Fleckfieberknötchen.

Nachdem auf diese Weise ein Passagevirus sichergestellt war, wurden nun in verschiedenen Zeitabständen mehrere Gruppen von Meerschweinchen bzw. Kaninchen nach vorausgegangenem Probeaderlaß mit virulenter Gehirnemulsion intrakardial und intravenös gespritzt. Es seien vorher die Meerschweinchenversuche angeführt:

Den Meerschweinchen B 9, B 10, B 11 und B 12 wird durch Herzpunktion je 1 ccm Herzblut entnommen und ohne Entfernung der Kanüle mit einer zweiten Spritze etwas virulentes Gehirn eines im Fieberstadium getöteten Meerschweinchens eingespritzt. Die Meerschweinchen B 9 und B 11 zeigen nach einer Inkubationszeit von 6 Tagen einen



plötzlichen Fieberanstieg auf 40° C; am 4. Fiebertage wird beiden durch Herzpunktion je 1 ccm Blut entnommen. Am Tage nach der Herzpunktion ist die Temperatur auf 38,8° C gesunken. Sie steigt aber am nächstfolgenden Tage wieder an und sinkt nach einer Gesamtfieberdauer von 7 Tagen beim Meerschweinchen B 9 und von 8 Tagen bei B 11 zur Norm herab. Eine Woche nach der Entfieberung wird bei beiden Meerschweinchen neuerlich durch Herzpunktion Blut entnommen.

Die Meerschweinchen B 10 und B 12 beginnen 5 bzw. 7 Tage nach der Injektion zu fiebern. Am 3. und 6. Fiebertage wird bei beiden je 1 ccm Blut aus dem Herzen entnommen. B 10 ist nach 6tägiger Fieberdauer fieberfrei, bei B 12 hält das Fieber bei einer Durchschnittstemperatur von 39,6° C 9 Tage an; bei beiden wird 2 Wochen nach der Entfieberung ein Aderlaß gemacht. Mit sämtlichen Blutproben wird, kurz nachdem sich das Serum abgeschieden hat, die Agglutination ausgeführt, und zwar werden dazu die 2 Varianten des $X_{19}$-Bacillus, der knopfförmig wachsende OX- und hauchförmig wachsende HX- und schließlich ein gut agglutinabler Typhusstamm herangezogen. 24stündige Kulturen der genannten Bacillen auf gewöhnlichem Schrägagar werden mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und zum Versuch verwendet. Die mit Serumverdünnungen und Kulturaufschwemmungen beschickten Röhrchen werden mit den entsprechenden Kontrollen ohne Serum 2 Stunden bei Bruttemperatur und weitere 20 Stunden bei Zimmertemperatur belassen. Die Agglutinationsprobe ergibt:

*Meerschweinchen B 9:*

1. Probeaderlaß:
   Typhusbacillen 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
   OX und HX 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
2. Aderlaß am 4. Fiebertag:
   Typhusbacillen 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
   OX und HX 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
3. Aderlaß 7 Tage nach der Entfieberung:
   Typhusbacillen 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
   OX und HX 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.

*Meerschweinchen B 10:*

1. Probeaderlaß:
   Typhusbacillen 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
   OX und HX 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
2. Aderlaß am 4. Fiebertag:
   Typhusbacillen 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 5 Spuren, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
3. Aderlaß 1 Woche nach der Entfieberung:
   Typhusbacillen 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 5 +, 1 : 10 ±, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 und 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 5 ±, 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.





*Meerschweinchen B 11:*

1. Probeaderlaß:
   Typhusbacillen 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
2. Aderlaß am 3. Fiebertage:
   Typhusbacillen 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
3. Aderlaß am 6. Fiebertage:
   Typhusbacillen 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 5 +, 1 : 10 ±. 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 5 ±, 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
4. Aderlaß 2 Wochen nach der Entfieberung:
   Typhusbacillen 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 5 +, 1 : 10 ±, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 5 ±, 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.

*Meerschweinchen B 12:*

1. Aderlaß vor der Infektion:
   Typhusbacillen 1 : 5 und 1 : 10 kaum Spuren, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
   OX und HX 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
2. Aderlaß am 3. Fiebertage:
   Titer unverändert.
3. Aderlaß am 6. Fiebertage:
   Titer unverändert.
4. Aderlaß 2 Wochen nach der Entfieberung:
   Titer unverändert.

Die nähere Betrachtung dieser Versuchsreihe ergibt, daß von 4 unter ganz gleichen Bedingungen mit dem gleichen Virus infizierten Meerschweinchen 2 eine Andeutung einer Agglutininproduktion gegenüber $X_{19}$-Bacillen aufweisen, und zwar treten die Agglutinine bei dem Meerschweinchen B 10 und B 11 auf, bei beiden erst gegen das Ende des Fieberstadiums. Bemerkenswert ist, daß die OX-Bacillen in einer relativ höheren Verdünnung vom Meerschweinchenserum agglutiniert werden als die HX-Bacillen. Diese Erscheinung ist von der menschlichen Pathologie her bekannt und hängt offenbar mit der für die Fleckfieberinfektion beim Menschen charakteristischen Vermehrung der OX-Agglutinine zusammen. Ferner sei auf die beim Meerschweinchen B 11 auftretende, wenn auch ganz geringe Vermehrung der Agglutinine gegen Typhusbacillen hingewiesen. Immerhin kommen die erreichten Titer den bei der menschlichen Erkrankung auftretenden nicht annähernd gleich. Bevor auf die Ursache dieser Erscheinung näher eingegangen wird, seien noch andere Versuche am Meerschweinchen angeführt.

8 Meerschweinchen, und zwar D 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 und 47 werden gleichzeitig mit frisch entnommenem Gehirn des auf der Höhe



des Fieberstadiums getöteten Meerschweinchens D 39 infiziert, und zwar die ersten 4 mit ganz minimalen Mengen Gehirnsuspension intrakardial, die letzten 4 mit relativ größeren Quantitäten intraperitoneal. Vor der Infektion wird bei sämtlichen Meerschweinchen ein Probeaderlaß gemacht. Die Meerschweinchen D 40, 41, 42 und 43 beginnen nach ca. 5—6 Tagen hoch zu fiebern, und zwar erreicht die Temperatur schon am 2. Fiebertag bei D 40 und D 42 40° C, bei D 41 und 43 39,5° C bzw. 40,5° C. Am 6. Fiebertage wird bei sämtlichen Tieren ein Probeaderlaß gemacht. Die Fieberdauer beträgt beim Meerschweinchen D 40 im ganzen 9 Tage, bei D 41 10 Tage und bei D 42 und 43 8 Tage. 2 Wochen und 4 Wochen nach der Entfieberung werden bei den 4 genannten Meerschweinchen kleine Blutmengen aus dem Herzen entnommen.

Im Gegensatz zu den so regelmäßig fiebernden Meerschweinchen, die intrakardial infiziert wurden, zeigen die intraperitoneal injizierten Meerschweinchen D 44 bis 47 einen viel unregelmäßigeren Fieberverlauf, und zwar beträgt die Inkubationszeit 8, 7, 6 und 13 Tage, die höchste Fieberelevation zeigt das Meerschweinchen D 46; die Fieberdauer beträgt im Maximum 6 Tage (D 47), im Minimum 3 Tage (D 45). Beim Meerschweinchen D 44 wird am 2. Fiebertage, bei D 45 am 3. Fiebertage, bei D 46 am 4. und bei D 47 am 6. Fiebertage und außerdem bei sämtlichen 4 Meerschweinchen 2 bzw. 4 Wochen nach der Entfieberung durch Herzpunktion je 1 ccm Blut gewonnen. Die angestellte Agglutinationsprobe ergibt:

*Meerschweinchen D 40:*

1. Probeaderlaß vor der Infektion:
   Typhusbacillen, OX und HX 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
2. Aderlaß am 6. Fiebertage:
   Keine Titersteigerung.
3. Aderlaß 2 Wochen nach der Entfieberung:
   Typhusbacillen 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 5 +, 1 : 10 ±, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 und 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 5 ±, 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
4. Aderlaß 4 Wochen nach der Entfieberung:
   Typhusbacillen 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 5 Spuren, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.

*Meerschweinchen D 41:*

1. Aderlaß vor der Infektion:
   Typhusbacillen, OX und HX 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
2. Aderlaß am 6. Fiebertage:
   Keine Titersteigerung.
3. Aderlaß 2 Wochen nach der Entfieberung:
   Titer unverändert.
4. Aderlaß nach der Entfieberung:
   Titer unverändert.



*Meerschweinchen D 42:*

1. Aderlaß vor der Infektion:
   Typhusbacillen, OX und HX 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
2. Aderlaß am 6. Fiebertage:
   Typhusbacillen 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 10 +, 1 : 20 ±, 1 : 40 Spuren, 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 10 +, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 und 1 : 80 negativ.
3. Aderlaß 2 Wochen nach der Entfieberung:
   Titer wie oben.
4. Aderlaß 4 Wochen nach der Entfieberung:
   Typhusbacillen 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 5 +, 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.

*Meerschweinchen D 43:*

1. Aderlaß vor der Entfieberung:
   Typhusbacillen OX und HX 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
2. Aderlaß Titer unverändert.
3. Aderlaß 2 Wochen nach der Entfieberung:
   Keine Agglutininvermehrung.
4. Aderlaß 4 Wochen nach der Entfieberung:
   Keine Titersteigerung.

*Meerschweinchen D 44:*

1. Aderlaß vor der Entfieberung:
   Typhusbacillen 1 : 5 Spuren, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
   OX und HX 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
2. Aderlaß am 2. Fiebertage:
   Keine Titersteigerung.
3. Aderlaß 2 Wochen nach der Entfieberung:
   Keine Agglutininvermehrung.
4. Aderlaß 4 Wochen nach der Entfieberung:
   Keine Titervermehrung.

*Meerschweinchen D 45:*

1. Aderlaß vor der Infektion:
   Typhusbacillen, OX und HX 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
2. Aderlaß am 3. Fiebertage:
   Wie oben.
3. Aderlaß 2 Wochen nach der Entfieberung:
   Keine Agglutininvermehrung.
4. Aderlaß 4 Wochen nach der Entfieberung:
   Titer unverändert.

*Meerschweinchen D 46:*

1. Aderlaß vor der Infektion:
   Typhusbacillen OX und HX 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
2. Aderlaß am 4. Fiebertage:
   Typhusbacillen 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 5 ±, 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 5 Spuren, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
3. Aderlaß 2 Wochen nach der Entfieberung:
   Agglutinintiter unverändert.
4. Aderlaß 4 Wochen nach der Entfieberung:
   Typhusbacillen, OX und HX 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.





*Meerschweinchen D 47:*

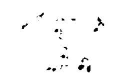
1. Aderlaß vor der Infektion:
   Typhusbacillen, OX und HX 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
2. Aderlaß am 6. Fiebertage:
   OX und HX negativ.
3. Aderlaß 2 Wochen nach der Entfieberung:
   Typhusbacillen 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 5 +, 1 : 10 ±, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
4. Aderlaß 4 Wochen nach der Entfieberung:
   Typhusbacillen 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 5 Spuren, 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.

Die Betrachtung der zuletzt angeführten Versuchsserien ergibt im wesentlichen eine Übereinstimmung mit der ersten, und zwar zeigt es sich, daß das Meerschweinchen im Prinzip imstande ist, unter dem Einfluß der Fleckfieberinfektion, wenn auch nur selten und in ganz geringen Mengen, Agglutinine gegen $X_{19}$-Bacillen zu bilden. Vergleicht man die Agglutinintiter der intrakardial infizierten Meerschweinchen mit denjenigen, die intraperitoneal gespritzt wurden, so ergibt sich eine Differenz zugunsten der intrakardial infizierten, in dem letztere anscheinend leichter und mehr Agglutinine gegen $X_{19}$-Bacillen bilden. Diese Erscheinung konnten wir in zahlreichen Versuchen bestätigt finden; sie dürfte mit der Schwere der Infektion, die sich beim intrakardialen Infektionsmodus in der längeren Fieberdauer und im höheren Fiebermaximum kundgibt, zusammenhängen. Es würde zu weit führen, wollte man die zahlreichen negativen Agglutinationsversuche anführen. Soviel sei jedoch bemerkt, daß von 80 intrakardial und von 30 intraperitoneal gespritzten Meerschweinchen 15 bzw. 5 eine geringe Titersteigerung gegenüber $X_{19}$-Bacillen zeigten. Die maximale Titersteigerung betrug für OX 1 : 20 und für HX 1 : 10. Daran änderte sich nichts, wenn man die Menge des infektiösen Materials erhöhte, oder wenn man nicht, wie gewöhnlich, mittelgroße Meerschweinchen von ca. 300 g Körpergewicht, sondern noch größere zu den Versuchen herangezogen hat.

Daß das Meerschweinchen Agglutinine gegen $X_{19}$ ziemlich leicht bildet, wenn es mit diesen Bacillen parenteral behandelt wird, konnten bereits *Ritz* und andere zeigen; das zeigt auch folgender Versuch:

Das Meerschweinchen N 12 bekommt nach vorausgegangenem Aderlaß $^1/_{10}$ Öse einer 24stündigen, in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmten Schrägagarkultur von OX intraperitoneal eingespritzt. 5 Tage darauf wird durch Herzpunktion eine kleine Blutmenge genommen und nochmals $^1/_{10}$ Öse OX-Bacillen intraperitoneal eingespritzt. Nach 10 Tagen wird 1 ccm Herzblut entnommen. Das Ergebnis der Agglutinationsprüfung war:





1. Aderlaß vor der Bacilleninjektion:
   OX 1 : 5 bis 1 : 80 negativ.
2. Aderlaß 5 Tage nach der ersten Injektion:
   OX 1 : 20 +, 1 : 40 Spuren, 1 : 80 negativ.
3. Aderlaß 10 Tage nach der 2. Injektion:
   OX 1 : 80 +, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.

Es folgt aus diesem Versuche, daß das Meerschweinchen ziemlich leicht Agglutinine gegen $X_{19}$-Bacillen liefert, wenn man es mit diesen Mikroorganismen parenteral behandelt. Wohl sind die erreichten Titerhöhen nicht so groß wie bei Kaninchen, welche mit $X_{19}$-Bacillen immunisiert wurden, immer aber größer, als wenn man das Meerschweinchen mit Fleckfiebervirus infiziert hat. Die letzterwähnte Erscheinung erschien uns um so merkwürdiger, als wir in Bestätigung der Befunde von *Weil* und *Felix* und von *Otto* und *Winkler* sehen konnten, daß das Kaninchen, dessen Fleckfieberinfektion klinisch fast unmerklich vorübergeht, ziemlich leicht und regelmäßig Agglutinine gegen $X_{19}$ bildet, wenn man es mit Fleckfiebervirus behandelt. Das mögen einige Versuche illustrieren:

Die Kaninchen F 1, F 2 und F 3 erhalten nach vorausgegangenem Probeaderlaß $^1/_{10}$ Gehirn des auf Fieberhöhe befindlichen Meerschweinchens B 4 intravenös eingespritzt. 6 Tage darauf wird aus der Ohrvene ein kleines Blutquantum entnommen und neuerlich $^1/_{10}$ Gehirn eines fleckfieberkranken Meerschweinchens eingespritzt. Dasselbe wird nach weiteren 6 Tagen wiederholt. Eine Woche darauf erhalten die Kaninchen nach einem kleinen Aderlaß neuerlich $^1/_{10}$ Gehirn eines hochfiebernden, mit Fleckfieber infizierten Meerschweinchens, worauf dann in Abständen von 6, 7 und 10 Tagen Kontrolladerlässe erfolgen. 2 Monate nach der ersten Injektion erhalten die Kaninchen wieder $^1/_{10}$ Gehirn eines fiebernden Meerschweinchens, nachdem vorher eine kleine Blutmenge aus der Ohrvene entnommen worden war. 2 weitere Aderlässe 10 bzw. 20 Tage darauf beendigen den Versuch. Die jeweils mit Typhusbacillen, OX- und HX-Bacillen angestellten Agglutinationsproben ergaben folgendes:

*Kaninchen F 1:*

1. Aderlaß vor der Infektion:
   Typhusbacillen 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 5 ±, 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
2. Aderlaß 6 Tage nach der Injektion von virulentem Gehirn:
   Typhusbacillen 1 : 10 ±, 1 : 20 bis 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 40 ++, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.

3. **Aderlaß 12 Tage nach der ersten Injektion und 6 Tage nach d. zweiten:**
   Typhusbacillen 1 : 10 bis 1 : 40 ++, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 40 +, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 und 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 40 +, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 und 1 : 320 negativ.
4. **Aderlaß 19 Tage nach der ersten und 7 Tage nach der dritten Injektion:**
   Typhusbacillen 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 20 +, 1 : 40 ±, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ
5. **Aderlaß 26 Tage nach der ersten und 6 Tage nach der vierten Injektion:**
   Typhusbacillen 1 : 20 Spuren, 1 : 40 bis 1 : 640 negativ.
   OX 1 : 20 Spuren, 1 : 40 bis 1 : 640 negativ.
   HX 1 : 20 bis 1 : 640 negativ.
6. **Aderlaß 33 Tage nach der ersten und 13 Tage nach der vierten Injektion:**
   Typhusbacillen 1 : 10 ++, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 negativ.
   OX 1 : 10 ±, 1 : 20 kaum Spuren, 1 : 40 negativ.
   HX 1 : 10 ±, 1 : 20 negativ.
7. **Aderlaß 43 Tage nach der ersten und 23 Tage nach der vierten Injektion:**
   Typhusbacillen 1 : 10 ++, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 negativ.
   OX 1 : 10 ±, 1 : 20 kaum Spuren, 1: 40 negativ.
   HX 1 : 10 ±, 1 : 20 negativ.
8. **Aderlaß 61 Tage nach der ersten und 41 Tage nach der vierten Injektion:**
   Typhusbacillen 1 : 10 ++, 1 : 20 ±, 1 : 40 Spuren, 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 kaum Spuren, 1 : 40 negativ.
   HX 1 : 10 kaum Spuren, 1 : 20 negativ.
9. **Aderlaß 71 Tage nach der ersten und 10 Tage nach der 5. Injektion:**
   Typhusbacillen 1 : 10 bis 1 : 40 ++, 1 : 80 ±, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 negativ.
   HX 1 : 10 negativ.
10. **Aderlaß 81 Tage nach der ersten und 20 Tage nach der fünften Injektion:**
   Typhusbacillen 1 : 10 ++, 1 : 20 +, 1 : 40 ±, 1 : 80 kaum Spuren.
   OX 1 : 10 ±, 1 : 20 kaum Spuren, 1 : 40 negativ.
   HX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 negativ.

*Kaninchen F 2:*

1. **Aderlaß vor der Infektion:**
   Typhusbacillen 1 : 5 +, 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 5 +, 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 5 +, 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
2. **Aderlaß 6 Tage nach der ersten Injektion:**
   Typhusbacillen 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 10 und 1 : 20 Spuren, 1 : 40 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
3. **Aderlaß 12 Tage nach der ersten und 6 Tage nach der zweiten Injektion von virulentem Gehirn:**
   Typhusbacillen 1 : 10 ++, 1 : 20 ±, 1 : 40 bis 1 : 320 negativ.
   OX bis 1 : 40 ++, 1 : 80 ±, 1 : 160 und 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 20 ++, 1 : 40 ±, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 und 1 : 320 negativ.
4. **Aderlaß 19 Tage nach der ersten und 7 Tage nach der dritten Injektion:**
   Typhusbacillen 1 : 20 bis 1 : 640 negativ.
   OX 1 : 20 ++, 1 : 40 ±, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 20 ±, 1 : 40 Spuren, 1 : 80 bis 1 : 640 negativ.



5. Aderlaß 26 Tage nach der ersten und 6 Tage nach der vierten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 20 bis 1 : 640 negativ.
   OX 1 : 20 Spuren, 1 : 40 bis 1 : 640 negativ.
   HX 1 : 20 bis 1 : 640 negativ.
6. Aderlaß 33 Tage nach der ersten und 13 Tage nach der vierten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 Spuren, 1 : 20 negativ.
   OX 1 : 10 ±, 1 : 20 negativ.
   HX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 negativ.
7. Aderlaß 43 Tage nach der ersten und 23 Tage nach der vierten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 kaum Spuren, 1 : 20 negativ.
   OX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 kaum Spuren, 1 : 40 negativ.
   HX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 negativ.
8. Aderlaß 61 Tage nach der ersten und 41 Tage nach der vierten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
9. Aderlaß 71 Tage nach der ersten und 10 Tage nach der fünften Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 negativ.
   OX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 negativ.
   HX 1 : 10 usw. negativ.
10. Aderlaß 81 Tage nach der ersten und 20 Tage nach der fünften Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 bis 1 : 640 negativ.
   OX 1 : 10 ±, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 negativ.
   HX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 kaum Spuren, 1 : 40 negativ.

*Kaninchen F 3:*

1. Aderlaß vor der Infektion:
   Typhusbacillen 1 : 5 +, 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 5 +, 1 : 10 +, 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 5 +, 1 : 10 +, 1 : 320 negativ.
2. Aderlaß 6 Tage nach der ersten Injektion von virulentem Gehirn:
   Typhusbacillen 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 10 ±, 1 : 20 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
3. Aderlaß 12 Tage nach der ersten Injektion und 6 Tage nach der zweiten:
   Typhusbacillen 1 : 10 +, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 bis 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 10 + +, 1 : 20 +, 1 : 40 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 + +, 1 : 20 +, 1 : 40 bis 1 : 320 negativ.
4. Aderlaß 19 Tage nach der ersten und 7 Tage nach der dritten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 +, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 bis 1 : 640 negativ.
   OX bis 1 : 80 + +, 1 : 160 +, 1 : 320 Spuren, 1 : 640 negativ.
   HX 1 : 40 + +, 1 : 80 +, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
5. Aderlaß 26 Tage nach der ersten und 6 Tage nach der vierten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 20 bis 1 : 640 negativ.
   OX 1 : 20 + +, 1 : 40 +, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 20 +, 1 : 40 ±, 1 : 80 negativ.
6. Aderlaß 33 Tage nach der ersten und 13 Tage nach der vierten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 Spuren, 1 : 20 negativ.
   OX 1 : 10 + +, 1 : 20 ±, 1 : 40 Spuren, 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 10 +, 1 : 20 ±, 1 : 40 negativ.



7. **Aderlaß 43 Tage nach der ersten und 23 Tage nach der vierten Injektion:**
   **Typhusbacillen 1 : 10 Spuren, 1 : 20 negativ.**
   **OX 1 : 10 ++, 1 : 20 ±, 1 : 40 kaum Spuren, 1 : 80 negativ.**
   **HX 1 : 10 ++, 1 : 20 ±, 1 : 40 negativ.**
8. **Aderlaß 61 Tage nach der ersten und 41 Tage nach der vierten Injektion:**
   **Typhusbacillen 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.**
   **OX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 kaum Spuren, 1 : 40 negativ.**
   **HX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 negativ.**
9. **Aderlaß 71 Tage nach der ersten und 10 Tage nach der fünften Injektion:**
   **Typhusbacillen 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.**
   **OX 1 : 10 ±, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 negativ.**
   **HX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 negativ.**
10. **Aderlaß 81 Tage nach der ersten und 20 Tage nach der fünften Injektion:**
   **Typhusbacillen 1 : 10 kaum Spuren, 1 : 20 negativ.**
   **OX 1 : 10 +, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 kaum Spuren.**
   **HX 1 : 10 ±, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 negativ.**

Aus der Betrachtung der zuletzt angeführten Versuchsserien, die sich auf die in verschiedenen Zeitabständen mit virulentem Meerschweinchengehirn intravenös gespritzten Kaninchen F 1, F 2 und F 3 erstreckt, ergibt sich, daß unvorbehandelte Kaninchen nach der Injektion virulenten Fleckfiebergehirns regelmäßig Agglutinine gegen $X_{19}$-Bacillen bilden, und zwar können schon 6 Tage nach der Injektion des virulenten Gehirns, wenn auch minimale Agglutininmengen auftreten. Es ist allerdings zu berücksichtigen, daß zur Injektion nicht der Fleckfiebererreger in Reinkultur, sondern ein Gemenge von Erregern und Gehirnzellen herangezogen wurde — eine Tatsache, die, wie weiter unten gezeigt werden soll, für die Auffassung der *Weil-Felix*schen Reaktion nicht ganz belanglos ist. Die bei allen 3 Kaninchen nach der 2. Injektion sichtbare Steigerung des Agglutinintiters könnte im ersten Moment ebenso aufgefaßt werden, als wie wenn man ein Kaninchen mit einem beliebigen Agglutinogen behandeln würde. Doch belehrt die weitere Beobachtung eines Besseren. Denn weitere Injektionen virulenten Materials ändern nicht viel an dem erreichten Titer, und nach Ablauf eines gewissen Zeitabschnittes, in der gegebenen Versuchsserie nach ca. 4 Wochen, beginnt der Agglutininspiegel allmählich zu sinken, unbeachtet der weiteren Behandlung mit virulentem Gehirn. Wenn der Titer nach Ablauf von ca. 2 Monaten zur Norm oder fast zur Norm gesunken ist, dann vermag eine neuerliche Injektion von virulentem Fleckfiebergehirn nichts wesentlich zu ändern.

Diese Tatsache berechtigt zur Anschauung, daß das Kaninchen unter dem Einfluß des Fleckfiebererregers Veränderungen erfährt, die sich im Auftreten einer positiven *Weil-Felix*schen Reaktion kundgeben, daß es also eine regelrechte Infektion durchmacht, in deren Gefolge sich eine Immunität einstellt. Diese Erscheinung spricht ferner dafür, daß die *Weil-Felix*sche Reaktion nicht, wie *Weil* und *Felix* annehmen,



die Folge einer agglutinogenen Funktion des Fleckfiebererregers ist. Denn wie wäre sonst die Erfahrungstatsache zu erklären, daß das Meerschweinchen, welches eine relativ schwerere Erkrankung durchmacht und welches auf die Injektion von $X_{19}$-Bacillen relativ leicht Agglutinine gegen diesen Mikroorganismus bildet, unter dem Einfluß der Fleckfieberinfektion nur ausnahmsweise und auch dann nur in geringen Mengen $X_{19}$-Agglutinine bildet. Hier müssen also noch andere Umstände im Spiele sein, die möglicherweise mit den besonderen Stoffwechselverhältnissen der verschiedenen Tierarten, eventuell auch mit der Konstitution des Organeiweißes zusammenhängen.

Die Kaninchenversuchsserie zeigt ferner — im Gegensatz zu *Weil* und *Felix* —, daß die Fleckfieberinfektion des Kaninchens nicht allein Agglutinine gegen $X_{19}$, sondern auch solche gegen Typhusbacillen hervorzurufen vermag. Dies ist besonders deutlich beim Kaninchen F 1 zu sehen, welches vor der Behandlung einen Agglutinintiter für Typhusbacillen 1:5 $\pm$ aufweist und im Verlaufe von kaum 2 Wochen nach der Infektion bereits einen Titer von 1 : 40 ++ und 1: 80 $\pm$ aufweist. Merkwürdigerweise sinkt der Agglutininspiegel für Typhusbacillen ziemlich parallel mit den $X_{19}$-Agglutininen. Die Erscheinung des Auftretens der Typhusagglutinine, die beim Kaninchen allerdings selten zu beobachten ist, ist in Analogie zu setzen zu der Erfahrungstatsache, daß, wie bereits eingangs erwähnt wurde, auch beim Menschen manchmal neben der positiven *Weil-Felix*schen Reaktion ein, wenn auch schwächerer *Gruber-Widal* zu beobachten ist. Daran ändert nichts die in der letzten Mitteilung von *Weil* und *Gruschka* aufgestellte Behauptung, daß die *Weil-Felix*sche Reaktion beim Kaninchen von reinster Spezifität ist, und daß bei diesem Tier „niemals“ das Auftreten von Agglutininen gegen Typhusbacillen zu beobachten ist.

In weiteren Versuchen sollte untersucht werden, ob auch eine einmalige Injektion von virulentem Fleckfiebergehirn die Produktion von $X_{19}$-Agglutininen zu verursachen vermag, wobei gleich bemerkt sein möge, daß durch die mehrmalige Immunisierung des Kaninchens mit einer Gehirnemulsion, welche durch Stehen, durch Erhitzen oder durch Zusatz von Desinfektionsmitteln avirulent gemacht wurde, keine *Weil-Felix*sche Reaktion zu erzielen war. Auf die seltenen Ausnahmen, wo dies der Fall war, soll weiter unten eingegangen werden, wo gezeigt werden soll, daß es unter Umständen gelingt, auch mit der Gehirnaufschwemmung gesunder Meerschweinchen oder mit anderen Antigenen, die weder das Fleckfiebervirus noch auch $X_{19}$-Bacillen enthalten, eine $X_{19}$-Agglutininproduktion zu erzielen. Jetzt seien einige Versuche über das Auftreten der *Weil-Felix*schen Reaktion beim Kaninchen nach einmaliger Injektion von kleinen Quantitäten von virulentem Gehirn angeführt:



Kaninchen F 7, F 8, F 9 und F 10 erhalten nach vorausgegangenem Aderlaß ein Zehntel Gehirn eines fleckfieberkranken Meerschweinchens intravenös eingespritzt. Es folgen hierauf Probeaderlässe in Zeitabständen von 9, 11, 14 und 22 Tagen nach der Infektion. Im Anschluß an den letzten Probeaderlaß wird allen Kaninchen neuerlich $^1/_{10}$ Gehirn eines fleckfieberkranken Meerschweinchens injiziert und nach weiteren 6, 16 und 23 Tagen nach dieser zweiten Infektion das Blut auf seine Agglutinationsfähigkeit Typhus- und $X_{19}$-Bacillen gegenüber geprüft.

*Kaninchen F 7:*

1. Aderlaß vor der Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 ±.
   OX 1 : 10 kaum Spuren, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
2. Aderlaß 9 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 Spuren.
   OX 1 : 10 kaum Spuren, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 10 kaum Spuren, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
3. Aderlaß 11 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 40 ++, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 40 ++, 1 : 80 +, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 40 ++, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
4. Aderlaß 14 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 20 ++, 1 : 40 ±, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
5. Aderlaß 22 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 20 ++, 1 : 40 ±, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 20 +, 1 : 40 ±, 1 : 80 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 20 +, 1 : 40 Spuren, 1 : 80 bis 1 : 320 negativ.
6. Aderlaß 30 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 ±.
   OX 1 : 10 +, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 ±, 1 : 20 kaum Spuren, 1 : 40 bis 1 : 320 negativ.
7. Aderlaß 36 Tage nach der ersten und 6 Tage nach der zweiten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 kaum Spuren, 1 : 20 bis 1 : 320 negativ.
8. Aderlaß 46Tage nach der ersten und 16 Tage nach der zweiten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 kaum Spuren, 1 : 20 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
9. Aderlaß 53Tage nach der ersten und 23 Tage nach der zweiten Injektion:
   Titer unverändert.

*Kaninchen F 8:*

1. Aderlaß vor der Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 20 Spuren, 1 : 40 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 80 negativ.
2. Aderlaß 9 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 20 ±, 1 : 40 negativ.
   OX 1 : 20 ++, 1 : 40 Spuren, 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 20 ++, 1 : 40 Spuren, 1 : 80 negativ.



3. Aderlaß 11 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 ±, 1 : 20 bis 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 10 ++, 1 : 20 +++, 1 : 40 ++, 1 : 80 +, 1 : 160 ±, 1 : 320 Spuren.
   HX 1 : 10 +, 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
4. Aderlaß 14 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 Spuren, 1 : 20 kaum Spuren, 1 : 40 negativ.
   OX 1 : 10 +, 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 ±, 1 : 20 ++, 1 : 40 ±, 1 : 80 +, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
5. Aderlaß 22 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 ±, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 negativ.
   OX 1 : 10 ±, 1 : 20 +, 1 : 40 ±, 1 : 80 kaum Skuren, 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 10 ±, 1 : 20 +, 1 : 40 Spuren, 1 : 80 negativ.
6. Aderlaß 30 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 Spuren, 1 : 20 negativ.
   OX 1 : 10 negativ, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 kaum Spuren, 1 : 20 bis 1 : 320 negativ.
7. Aderlaß 36 Tage nach der ersten und 6 Tage nach der zweiten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 Spuren, 1 : 20 kaum Spuren, 1 : 40 negativ.
   OX 1 : 10 negativ, 1 : 20 kaum Spuren, 1 : 40 negativ.
   HX 1 : 10 usw. negativ.
8. Aderlaß 46Tage nach der ersten und 16 Tage nach der zweiten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 10 kaum Spuren, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
9. Aderlaß 53 Tage nach der ersten und 23 Tage nach der letzten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 81 negativ.
   OX 1 : 10 ±, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 und 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 kaum Spuren, 1 : 40 und 1 : 80 negativ.

*Kaninchen F 9:*

1. Aderlaß vor der Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 Spuren, 1 : 20 kaum Spuren, 1 : 40 negativ.
   OX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 kaum Spuren, 1 : 40 negativ.
   HX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 40 negativ.
2. Aderlaß 9 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 Spuren, 1 : 20 kaum Spuren, 1 : 40 negativ.
   OX 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 20 ++, 1 : 40 ±, 1 : 80 kaum Spuren, 1 : 160 negativ.
3. Aderlaß 11 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 Spuren, 1 : 20 kaum Spuren, 1 : 40 negativ.
   OX 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 20 ++, 1 : 40 ±, 1 : 80 kaum Spuren, 1 : 160 negativ.
4. Aderlaß 14 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 ±, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 negativ.
   OX 1 : 40 ++, 1 : 80 +, 1 : 160 ±, 1 : 320 Spuren.
   HX 1 : 40 ++, 1 : 60 ±, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
5. Aderlaß 22 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 20 ++, 1 : 40 ±, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 20 ++, 1 : 40 ±, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.





6. Aderlaß 30 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 Spuren, 1 : 20 negativ.
   OX 1 : 10 ±, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
7. Aderlaß 36 Tage nach der ersten und 6 Tage nach der zweiten Injektion:
   Titer unverändert.
8. Aderlaß 46 Tage nach der ersten u. 16 Tage nach der zweiten Injektion:
   Titer unverändert.
9. Aderlaß 53 Tage nach der ersten u. 23 Tage nach der zweiten Injektion:
   Titer unverändert.

*Kaninchen F 10:*

1. Aderlaß vor der Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
2. Aderlaß 9 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 20 +, 1 : 40 ±, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 20 +, 1 : 40 Spuren, 1 : 80 kaum Spuren, 1 : 160 negativ.
3. Aderlaß 11 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 40 + +, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 40 +, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
4. Aderlaß 14 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren.
   OX 1 : 40 + +, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren.
   HX 1 : 40 +, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
5. Aderlaß 22 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren.
   OX 1 : 20 +, 1 : 40 ±, 1 : 80 negativ.
   HX 1 : 20 ±, 1 : 40 Spuren, 1 : 80 negativ.
6. Aderlaß 30 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren.
   OX 1 : 10 ±, 1 : 20 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 320 negativ.
7. Aderlaß 36 Tage nach der ersten und 6 Tage nach der zweiten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren.
   OX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
8. Aderlaß 46 Tage nach der ersten u. 16. Tage nach der zweiten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
9. Aderlaß 53 Tage nach der ersten und 23 Tage nach der zweiten Injektion
   Titer unverändert.

Die letzte Versuchsserie zeigt in Übereinstimmung mit *Weil* und *Felix* und mit *Otto* und *Winkler*, daß auch eine einmalige Injektion von virulentem Fleckfiebergehirn genügt, um beim Kaninchen $X_{19}$-Agglutinine hervorzurufen, und zwar treten die ersten Antikörper gegen das Ende der zweiten Woche nach der Injektion auf, erreichen nach 2 Wochen das Maximum und sinken dann allmählich ab, bis nach Ablauf von

ca. 1 Monat der Agglutinationsspiegel fast zur Norm zurückgekehrt ist. Das Kaninchen F 7 zeigt auch einen leichten Anstieg der Typhusagglutinine im Verlauf der Fleckfieberinfektion. Eine zweite Injektion, die erfolgt, nachdem der Agglutininspiegel zur Norm zurückgekehrt ist, vermag, wie dies die Versuchsserie ganz eindeutig zeigt, keine neuerliche Produktion von $X_{19}$-Agglutininen zu verursachen. Es sei ferner auf die in allen diesen Versuchen zutage tretende Erscheinung hingewiesen, daß die O-Form in einem höheren Titer agglutiniert wird als die Form der $X_{19}$-Bacillen.

Der Ausfall der bisher angeführten Versuche zeigt also unzweideutig, daß das Kaninchen auf die Injektion des Fleckfiebervirus anders reagiert als das Meerschweinchen, indem letzteres nur ganz selten und dann in ganz geringer Menge, während das erstere ziemlich regelmäßig Agglutinine gegen $X_{19}$-Bacillen produziert, obzwar der Verlauf der Fleckfieberinfektion beim Meerschweinchen ein viel schwererer ist und auch die Zahl der sich vermehrenden Fleckfieberkeime eine bedeutend höhere ist als im Kaninchenorganismus. Millionenfache Verdünnungen der Aufschwemmung eines virulenten Meerschweinchengehirns vermögen beim Meerschweinchen eine Infektion zu erzeugen, allerdings nur bei der von uns hier angeführten intrakardialen Injektionstechnik. Infiziert man die Meerschweinchen intraperitoneal, dann beträgt die kleinste infizierende Gehirnmenge ca. 0,001 g (*Landsteiner*).

Im Gegensatz dazu scheint die Erregerzahl im Kaninchenorganismus geringer zu sein, wie dies aus den ziemlich häufigen Versagern bei Rückübertragungsversuchen vom infizierten Kaninchen auf Kaninchen oder Meerschweinchen zu schließen ist. Allerdings wäre noch an eine Modifikation des Fleckfiebervirus im Kaninchenorganismus zu denken.

Wie ist nun das so abweichende Verhalten des Meerschweinchens in serologischer Beziehung zu erklären? Es kommen hauptsächlich folgende, bereits gestreifte Möglichkeiten in Betracht:

1. Entweder ist die *Weil-Felix*sche Reaktion eine Folge indirekter, durch die Infektion bedingter Blutveränderungen, die im Organismus verschiedener Tierarten (Mensch, Kaninchen, Meerschweinchen) verschieden ablaufen; dann wäre die negative oder mangelhaft ausgeprägte *Weil-Felix*sche Reaktion beim Meerschweinchen auf den abweichenden Stoffwechsel dem Kaninchen und besonders dem Menschen gegenüber zurückzuführen, oder

2. das Meerschweinchen bildet auch $X_{19}$-Agglutinine, die jedoch durch die besondere Beschaffenheit seines Organeiweißes im Blute nicht nachweisbar sind; wir denken hier in erster Linie an gemeinsame Receptoren zwischen dem Agglutinin bzw. dem Fleckfiebererreger und den Organzellen des Meerschweinchens. Analogien dieser Art sind ja in der Im-

munitätslehre nicht unbekannt. Es gelingt ja bekanntlich kaum oder nur äußerst selten, beim Meerschweinchen hammelhämolytische Amboceptoren durch Injektion des entsprechenden Antigens (z. B. Meerschweinchenniere) zu erzeugen, da das Meerschweinchen in seinen Organzellen eben von Haus aus die für die Entstehung der Amboceptoren ausschlaggebenden Receptoren besitzt.

3. Wäre noch an eine Kombination der unter 1. und 2. angeführten Möglichkeiten zu denken.

Für die erste Möglichkeit können wir keine konkreten Beweise anführen, obwohl sie uns recht plausibel erscheint. An die zweite Möglichkeit dachten schon *Weil* und *Felix*, die versucht haben, mit normalen Meerschweinchenorganen beim Kaninchen $X_{19}$-Agglutinine zu erzeugen bzw. aus agglutinierenden Fleckfieberseren die Agglutinine durch Meerschweinchenorgane zu absorbieren, jedoch mit negativem Erfolg. Unsere Versuche ergaben aber in Übereinstimmung mit *Doerr* und *Pick* und *Russ* und *Kirschner* Anhaltspunkte für diese zweite Annahme. Das mögen folgende Versuche demonstrieren:

Die ungebrauchten Kaninchen F 15, F 16, F 17 und F 18 erhalten nach vorausgegangenem Aderlaß $^1/_{10}$ Gehirn eines ungebrauchten gesunden Meerschweinchens intravenös eingespritzt. 5 Tage darauf wird neuerlich ein Aderlaß gemacht und $^1/_{10}$ Gehirn eines normalen Meerschweinchens injiziert. Nachdem 5 Tage hierauf dasselbe wiederholt wurde, folgen dann in Abständen von 6 und 8 Tagen Probeaderlässe und 3 Wochen nach dem letzten Aderlaß eine intravenöse Injektion von virulentem Gehirn eines mit Fleckfieber injizierten Meerschweinchens. Zwei weitere Aderlässe in Abständen von 10 bzw. 20 Tagen nach der letztgenannten Infektion dienten zur Feststellung des Agglutinintiters.

*Kaninchen F 15:*

1. Aderlaß vor der Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
2. Aderlaß 5 Tage nach der ersten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 bis 1 : 40 ++, 1 : 80 ±, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 40 ++, 1 : 80 +, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
3. Aderlaß 10 Tage nach der ersten und 5 Tage nach der zweiten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 20 +, 1 : 40 Spuren, 1 : 80 bis 1 : 640 negativ.
   OX 1 : 20 bis 1 : 640 negativ.
   HX 1 : 20 bis 1 : 640 negativ.
4. Aderlaß 16 Tage nach der ersten und 6 Tage nach der dritten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 20 ++, 1 : 40 ±, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
5. Aderlaß 24 Tage nach der ersten und 14 Tage nach der dritten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 ++, 1 : 20 +, 1 : 40 ±, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 160 negativ.





6. Aderlaß 3 Wochen nach der dritten Injektion normalen Gehirns:
   Typhusbacillen 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 160 negativ.
7. Aderlaß 10 Tage nach der Injektion virulenten Fleckfiebergehirns:
   Typhusbacillen 1 : 40 ++, 1 : 160 +, 1 : 320 Spuren, 1 : 640 negativ.
   OX 1 : 20 ++, 1 : 40 ±, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 10 ±, 1 : 20 +, 1 : 40 Spuren, 1 : 80 negativ.
8. Aderlaß 20 Tage nach der Injektion des virulenten Gehirns:
   Typhusbacillen 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 20 +, 1 : 40 ±, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 20 +, 1 : 40 ±, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.

*Kaninchen F 16:*

1. Aderlaß vor der Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 20 bis 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 20 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 20 bis 1 : 320 negativ.
2. Aderlaß 5 Tage nach der ersten Injektion normalen Gehirns:
   Typhusbacillen 1 : 20 ++, 1 : 40 ±, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 und 1 : 20 ±, 1 : 40 und 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 60 negativ.
3. Aderlaß 10 Tage nach der ersten und 5 Tage nach der zweiten Injektion normalen Gehirns:
   Typhusbacillen 1 : 20 +, 1 : 40 Spuren, 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 20 bis 1 : 640 negativ.
   HX 1 : 20 bis 1 : 640 negativ.
4. Aderlaß 16 Tage nach der ersten und 6 Tage nach der dritten Injektion normalen Gehirns:
   Typhusbacillen 1 : 20 ++, 1 : 40 ±, 1 : 80 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 160 negativ.
5. Aderlaß 24 Tage nach der ersten und 14 Tage nach der dritten Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 ++, 1 : 20 +, 1 : 40 ±, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 140 negativ.
6. Aderlaß 3 Wochen nach der dritten Injektion normalen Gehirns:
   Titer unverändert.
7. Aderlaß 10 Tage nach der Injektion virulenten Fleckfiebergehirns:
   Typhusbacillen 1 : 40 ++, 1 : 80 +, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 10 kaum Spuren, 1 : 20 bis 1 : 310 negativ.
   HX 1 :10 bis 1 : 320 negativ.
8. Aderlaß 20 Tage nach der Injektion virulenten Gehirns:
   Typhusbacillen 1 : 10 bis 1 : 40 +, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 +, 1 : 20 ±, 1 : 80 kaum Spuren, 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 10 +, 1 : 20 ±, 1 : 40 bis 1 : 160 negativ.

*Kaninchen F 17:*

1. Aderlaß vor der Injektion:
   Typhusbacillen 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 320 negativ.



2. Aderlaß 5 Tage nach der ersten Injektion normalen Gehirns:
   Typhusbacillen 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 160 negativ.
3. Aderlaß 10 Tage nach der ersten und 5 Tage nach der zweiten Injektion normalen Gehirns:
   Keine Titersteigerung.
4. Aderlaß 16 Tage nach der ersten und 6 Tage nach der dritten Injektion normalen Gehirns:
   Keine Titersteigerung.
5. Aderlaß 24 Tage nach der ersten und 14 Tage nach der dritten Injektion:
   Titer unverändert.
6. Aderlaß 3 Wochen nach der dritten Injektion normalen Gehirns:
   Titer unverändert.
7. Aderlaß 10 Tage nach der Injektion virulenten Fleckfiebergehirns:
   Typhusbacillen 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 +, 1 : 20 + +, 1 : 40 +, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 10 ±, 1 : 20 +, 1 : 40 ±, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
8. Aderlaß 20 Tage nach der Injektion virulenten Gehirns:
   Typhusbacillen 1 : 10 kaum Spuren, 1 : 20 bis 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 +, 1 : 40 + +, 1 : 80 +, 1 : 160 ±, 1 : 320 Spuren.
   HX 1 : 10 ±, 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.

*Kaninchen F 18:*

1. Aderlaß vor der Injektion normalen Gehirns:
   Typhusbacillen bis 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 80 negativ.
2. Aderlaß 5 Tage nach der ersten Injektion normalen Gehirns:
   Typhusbacillen 1 : 10 bis 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 160 negativ.
3. Aderlaß 10 Tage nach der ersten und 5 Tage nach der zweiten Injektion normalen Gehirns:
   Titer unverändert.
4. Aderlaß 16 Tage nach der ersten und 6 Tage nach der dritten Injektion normalen Gehirns:
   Titer unverändert.
5. Aderlaß 24 Tage nach der ersten und 14 Tage nach der dritten Injektion normalen Gehirns:
   Keine Titersteigerung.
6. Aderlaß 3 Wochen nach der dritten Injektion normalen Gehirns:
   Titer unverändert.
7. Aderlaß 10 Tage nach der Injektion virulenten Fleckfiebergehirns:
   Typhusbacillen 1 : 10 bis 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 ±, 1 : 20 Spuren, 1 : 40 bis 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 10 Spuren, 1 : 20 bis 1 : 160 negativ.
8. Aderlaß 20 Tage nach der Injektion virulenten Gehirns:
   Typhusbacillen 1 : 10 bis 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 80 + +, 1 : 160 +, 1 : 320 Spuren, 1 : 640 negativ.
   HX 1 : 40 + +, 1 : 80 +, 1 : 160 ±, 1 : 320 negativ.





Es erhellt aus den letzten 4 Versuchen, daß es unter gewissen Umständen möglich ist, bei Kaninchen durch Injektion normalen Meerschweinchengehirns eine $X_{19}$-Agglutininproduktion anzuregen. Am deutlichsten ist das bei Kaninchen F 15 zu sehen, welches schon 5 Tage nach der 1. Injektion einen Titer von 1 : 80 + und 1 : 160 Spuren aufweist, und zwar OX-Bacillen gegenüber; Agglutinine für HX-Bacillen konnten merkwürdigerweise nicht festgestellt werden. Bemerkenswert ist, daß unter dem Einflusse der zweiten Injektion normalen Gehirns die etwa auftretenden agglutinierenden Antikörper verschwinden, und zwar fast in spezifischer Weise, denn die gleichzeitig aufgetretenen Typhusbacillenagglutinine bleiben auch weiter bestehen. Sämtliche Tiere zeigen unter dem Einflusse der mehrere Wochen nach der letzten Injektion normalen Meerschweinchengehirns vorgenommenen Infektion mit virulentem Fleckfiebergehirn einen Anstieg der $X_{19}$-Agglutinine, der sich aber diesmal sowohl auf die OX- als auch auf die HX-Form erstreckt.

Diese Versuchsergebnisse lassen den Schluß zu, daß zwischen dem Meerschweinchenorganeiweiß und dem $X_{19}$-Agglutinine produzierenden Antigen irgendeine Verwandtschaft besteht. Wenn dieser Schluß richtig sein sollte, dann war zu erwarten, daß man auch mit einem anderen, Hammelamboceptoren liefernden Antigen $X_{19}$-Agglutinine beim Kaninchen erzeugen könnte. Von drei derartigen mit Hammelerythrocyten ausgeführten Immunisierungsversuchen ergaben zwei ein negatives und einer ein positives Resultat. Dieser letzte positive Versuch sei hier angeführt:

Kaninchen B 1 wird nach vorausgegangenem Probeaderlaß in Abständen von 5 Tagen zweimal mit 15 ccm gewaschenen Hammelblutes intraperitoneal und 10 Tage darauf mit 2 ccm Hammelblut intravenös gespritzt. Der auf diese Weise erzielte hammelhämolytische Titer betrug 1 : 1000. Die Agglutinationsproben ergaben folgendes Resultat:

1. Aderlaß vor der Behandlung mit Hammelblut:
   Typhusbacillen 1 : 40 +, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   OX 1 : 10 bis 1 : 160 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 160 negativ.
2. Aderlaß nach mehrmaliger Behandlung mit Hammelerythrocyten:
   Typhusbacillen 1 : 40 +, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
   OX bis 1 : 40 + +, 1 : 80 +, 1 : 160 ±, 1 : 320 Spuren, 1 : 640 negativ.
   HX 1 : 10 bis 1 : 640 negativ.

Dieser Versuch beweist also, daß es manchmal gelingt, auch mit Hammelerythrocyten einen elektiven Anstieg der $X_{19}$-Agglutinine im Kaninchenserum zu erzielen, der sich bemerkenswerterweise nur auf die O-Form erstrecken kann.

Zum Schluß sei noch ein Absorptionsversuch mit Meerschweinchenorganen und einem agglutinierenden Fleckfieberserum angeführt.



Das Gehirn eines ungebrauchten Meerschweinchens und beide Nieren desselben Tieres werden in physiologischer Kochsalzlösung verrieben, mehrmals auf der Zentrifuge gewaschen und hierauf die physiologische Kochsalzlösung vom Sedimente abgegossen. Das Sediment wird in je 5 ccm einer Verdünnung 1 : 5 eines agglutinierenden Fleckfieberserums vom Kaninchen verteilt und bei 37° C 1 Stunde lang stehengelassen. Nachdem während dieser Zeit mehrmals umgerührt worden war, wird das Serum nach dem Zentrifugieren auf seinen Gehalt an $X_{19}$-Agglutininen untersucht. Das Ergebnis war folgendes:

Serum vor der Behandlung:
OX 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
HX 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.
Serum nach der Behandlung mit Meerschweinchengehirn:
OX 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 Spuren, 1 : 160 negativ.
HX 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 kaum Spuren, 1 : 160 negativ.
Serum nach der Behandlung mit Meerschweinchennieren:
OX 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 kaum Spuren, 1 : 320 neg.
HX 1 : 20 ++, 1 : 40 +, 1 : 80 ±, 1 : 160 Spuren, 1 : 320 negativ.

Dieses Versuchsergebnis lehrt, daß es möglich ist, aus einem agglutininhaltigen Fleckfieberkaninchenserum einen Teil der Antikörper durch Meerschweinchengehirn zu absorbieren. Dagegen zeigt die Behandlung des Agglutininserums mit Meerschweinchenniere keine wesentliche Änderung des Agglutinintiters.

## *Zusammenfassung.*

Es werden zuerst die verschiedenen bisher aufgestellten Theorien über das Wesen der *Weil-Felix*schen Reaktion beim Kaninchen diskutiert. Auf Grund des in der Literatur vorliegenden Tatsachenmaterials konnte keiner Hypothese für das Zustandekommen der *Weil-Felix*schen Reaktion eine besondere Bedeutung zuerkannt werden, bis auf jene, welche diese Immunitätserscheinung als direkte oder indirekte Folge einer heterogenetischen Funktion des Fleckfiebererregers auffaßt.

In entsprechenden Versuchen wurde gezeigt, daß das Meerschweinchen, welches durch Behandlung mit $X_{19}$-Bacillen ziemlich leicht agglutinierende Antikörper bildet, unter dem Einfluß der Fleckfieberinfektion nur selten und spärliche Agglutinine gegen $X_{19}$-Bacillen aufweist. Im Gegensatz dazu produziert das Kaninchen nach der Infektion mit virulentem Fleckfiebergehirn regelmäßig Agglutinine für $X_{19}$-Bacillen. Für diesen auffallenden Gegensatz im Verhalten des Meerschweinchens einerseits und des Kaninchens und des Menschen andererseits kommen drei Möglichkeiten in Betracht: 1. entweder ist die *Weil-Felix*sche Reaktion eine Folge indirekter durch die Infektion bedingter Blutveränderungen, die im Organismus verschiedener Tierarten (Mensch, Kaninchen, Meerschweinchen) verschieden ablaufen; dann wäre die negative oder mangelhaft ausgeprägte *Weil-Felix*sche Reaktion beim Meerschweinchen auf den abweichenden Stoffwechsel dieses Tieres dem Kaninchen



und besonders dem Menschen gegenüber zurückzuführen, oder 2. das Meerschweinchen bildet auch $X_{19}$-Agglutinine, die jedoch durch die besondere Beschaffenheit seines Organeiweißes im Blute nicht nachweisbar sind; dabei wurde in erster Linie an einen gemeinsamen Receptor zwischen dem Agglutinin bzw. dem Fleckfiebererreger und den Organzellen des Meerschweinchens gedacht; 3. wäre noch an eine Kombination der unter 1. und 2. angeführten Möglichkeiten zu denken.

Während für die erste, wenn auch ganz plausible Annahme, keine konkreten Beweise angeführt werden können, ergaben geeignete Versuche Anhaltspunkte für die zweite Möglichkeit: denn es gelang, einerseits mit normalen Meerschweinchengehirnen beim Kaninchen $X_{19}$-Agglutinine zu produzieren, andererseits aus einem agglutinierenden Kaninchenfleckfieberserum die Agglutinine durch Meerschweinchengehirn teilweise zu absorbieren. Ähnlich wie das Meerschweinchengehirn verhielten sich manchmal Hammelerythrocyten. Diese Versuchsergebnisse berechtigen zu der Annahme, daß zwischen dem $X_{19}$-Agglutinine produzierenden Fleckfiebererreger und den Hammelhämolysine produzierenden heterogenetischen Antigenen eine gewisse Verwandtschaft besteht.

## Literaturverzeichnis.

*Aoki* und *Kondo*, The Tohoku Journ. of exp. med. **3**, Heft 3/4. 1922. — *Braun* und *Salomon*, Dtsch. med. Wochenschr. 1918, Nr. 3. — *Braun* und *Salomon*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. Heft 3/4. 1918. — *Doerr* und *Pick*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **80**, Heft 2. — *Fürth*, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **16**. 1912. — *Fürth*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **70**. 1912. — *Horiuschi*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **46**, 586. — *Kolle* und *Schloßberger*, Med. Klinik. 1917, Nr. 10. — *Landsteiner* und *Hausmann*, Med. Klinik 1918, Nr. 21. — *Müller, P. Th.*, Münch. med. Wochenschr. 1913, S. 1364. — *Mühlens* und *Stojanoff*, Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg. **51**. 1917. — *Oettinger*, Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. **80**. 1918. — *Otto*, Dtsch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 30. — *Otto* und *Winkler*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **93**. 1921. — *Plotz*, Presse méd. Mai 1914 und Journ. of the Americ. med. assoc. 1914, S. 1556. — *Rabinowitsch, M.*, Arch. f. Hyg. **71**. 1909. — *Rabinowitsch, M.*, Münch. med. Wochenschr. 1913, S. 245. — *Rochalims*, in Lubarsch-Ostertag, Ergebn. d. allg. Pathol. 1919. — *Ruß* und *Krischner*, Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 1921. — *Weil* und *Felix*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap., Orig. **31**. 1921. — *Weil* und *Gruschka*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **33**. 1921. — *Weltmann*, Wien. klin. Wochenschr. 1916, S. 19. — *Wilson*, Journ. of hyg. **10**, 155. 1910. — *Wilson*, Brit. med. journ. 1917. — *Wolf*, 9. Tag. d. Deutsch. Verein. f. Mikrobiol. Juni 1922, Würzburg. Zentralbl. f. Bakt. Orig. **89**. — *Papamarku*, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therap., Orig. **87**.



(Aus dem Institut „Robert Koch", Berlin [Abt. Prof. Dr. *Jos. Koch*].)

# Die experimentelle Erzeugung der Halslymphdrüsentuberkulose durch orale und conjunctivale Infektion und ihre Beziehungen zu den Erkrankungen der übrigen Organe, insbesondere der Lungen.

Mit 3 Textabbildungen.

Von

Prof. Dr. **Jos. Koch** und Dr. **W. Baumgarten.**

Bei unseren Arbeiten über die Infektionswege der Tuberkulose haben wir einen großen Teil unserer Versuchstiere, Meerschweinchen und Kaninchen, per os infiziert. Nach dem es bereits *Jos. Koch* und *B. Möllers*[1]) gelungen war, durch eine orale Infektion beim Kaninchen eine isolierte, hauptsächlich auf die Oberlappen und die freien Ränder der Lungen beschränkte, chronisch verlaufende, der menschlichen Lungentuberkulose ähnliche Erkrankung zu erzeugen, kam es uns darauf an, durch weitere Versuche festzustellen, wie häufig eine derartige Erkrankung sich durch Fütterung erzielen läßt und welchen Weg die Infektion dabei einschlägt.

Dabei sind wir häufig einem Krankheitsbild begegnet, das man wohl als ein *typisches* bezeichnen kann. Um so auffälliger ist es, daß es in der Literatur bisher als ein solches kaum bekannt und beschrieben ist. Das Studium dieses Krankheitsbildes erschien uns deshalb besonders aussichtsreich, weil damit wichtige, bisher ungeklärte Fragen, z. B. die der Resorption der Tuberkelbacillen von der Mund- und Rachenhöhle, die Entstehung der Halsdrüsen- und Lungentuberkulose vom Intestinaltraktus aus, eng verknüpft sind.

Wir wollen zunächst das Krankheitsbild, wie es sich bei unseren Versuchen in der überwiegenden Mehrzahl darstellte, kurz beschreiben.

Bringt man einem Meerschweinchen wenige Tropfen einer durch Verreiben in Kochsalzlösung hergestellten Aufschwemmung von Tuberkelbacillen vorsichtig auf die Zunge oder die Mundschleimhaut, so kommt es in den folgenden Wochen oder Monaten zu einer starken Anschwellung ganz bestimmter Halslymphdrüsengruppen. Die Drüsen-

[1]) Zur Frage der Infektionswege der Tuberkulose. Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 33 und Veröffentl. d. Robert-Koch-Stiftung z. Bekämpf. d. Tub. **2**, Heft 3.



pakete lassen sich oft schon beim lebenden Tiere durch Palpation des Halses feststellen. Im übrigen erscheinen die Tiere wenig verändert. Sie machen im allgemeinen einen normalen Eindruck, was auch dadurch in die Erscheinung tritt, daß das Körpergewicht der Tiere in vielen Fällen nicht ab-, sondern sogar zunimmt; das ist besonders bei den Tieren der Fall, bei denen die tuberkulöse Erkrankung hauptsächlich auf den Drüsenapparat des Halses beschränkt bleibt. Im weiteren Verlaufe der tuberkulösen Infektion nehmen auch andere Körperorgane, vornehmlich die Lungen und die Milz, an der Erkrankung teil. Der Grad und die Dauer des Krankheitsprozesses sind natürlich bei den einzelnen Versuchstieren verschieden. Worauf dies beruht, wird in den folgenden Ausführungen noch zu erörtern sein. Im ersten Stadium der Drüsenerkrankung, *die ganz dem Bilde der Skrofulose des Kindes* entspricht, scheint die tuberkulöse Infektion auf die Halslymphdrüsen beschränkt zu sein; es würde sich anfangs also um eine isolierte Halslymphdrüsentuberkulose handeln. Das Krankheitsbild des Kaninchens unterscheidet sich von dem des Meerschweinchens nur insofern, als die Hyperplasie der Halslymphdrüsen geringer, die Verkäsung dagegen stärker ist. Wichtig ist, daß das Krankheitsbild der Halsdrüsentuberkulose sich auch bei den genannten Versuchstieren entwickelt, wenn sie *conjunctival* infiziert werden.

### *Technik.*

Die benutzten Tuberkelbacillenstämme waren keine alten Laboratoriumskulturen, sondern von uns selbst aus tuberkulösen Veränderungen des Menschen und des Rindes frisch gezüchtet; sie wurden in der üblichen Weise durch Passage über den Meerschweinchenkörper gewonnen. Die mit tuberkulösen Organstückchen infizierten Meerschweinchen wurden durchschnittlich 6 Wochen später unter aseptischen Kautelen obduziert, die tuberkulös erkrankte Milz zu einem feinen Brei verrieben, der dann teils auf Rinderserum, teils auf Eiernährböden gebracht wurde. Die Stämme kamen zur Benutzung, wenn sie zwei bis vier Glycerinbouillon-Überimpfungen hinter sich hatten. Virulenzprüfungen der einzelnen Stämme haben wir zwar nicht angestellt; im allgemeinen kann man aber wohl sagen, daß solche frischen Stämme noch ihre originale Virulenz haben.

Alte, jahrelang fortgezüchtete Laboratoriumsstämme haben wir deshalb nicht verwendet, weil ihre Virulenz im Laufe der Zeit gelitten haben konnte, besonders dann, wenn sie nicht hin und wieder eine Tierpassage durchgemacht haben. Sie sind dann zwar noch infektionstüchtig; bei ihrer Verwendung sind aber oft viel größere Infektionsdosen notwendig, als bei frischen Stämmen. Die sich vielfach widersprechenden Resultate vieler Tuberkulosearbeiten sind zum Teil auf den Virulenzunterschied der Kulturen zurückzuführen. Wir sind der Überzeugung, daß diesem Umstande doch eine erhebliche Bedeutung beizumessen ist, und wir halten die Anregung für durchaus am Platze, zu Tuberkuloseversuchen möglichst frische Stämme zu verwenden; damit würde man den natürlichen Verhältnissen besser Rechnung tragen: *denn in praxi erfolgt die Ansteckung ja auch mit Tuberkelbacillen, die vielleicht erst wenige Minuten vorher die tuberkulöse Lunge eines Kranken durch einen Hustenstoß verlassen haben.*



Die zur Infektion nötigen Bacillenverreibungen wurden in folgender Weise hergestellt. Eine auf Glycerinbouillon gewachsene Oberflächenkultur wurde zwischen Fließpapier getrocknet, die Menge genau abgewogen, im Achatmörser verrieben und in bestimmten Kochsalzmengen aufgeschwemmt. Gewöhnlich wurden 10 mg getrockneter Bacillenkultur in 5 ccm Kochsalz aufgeschwemmt und dann weitere Verdünnungen durch entsprechende Mengen NaCl-Lösungen hergestellt.

Bezüglich der *Menge* der in einem Milligramm enthaltenen Tuberkelbacillen haben wir uns der Angabe von *Findel* angeschlossen. Es sei bemerkt, daß die Richtigkeit dieser Angabe bestritten wird. *Selter* (Veröffentlichungen der Robert-Koch-Stiftung, Heft 11/12, S. 86) nimmt wohl mit Recht an, daß ebenso wie bei anderen Bakterienarten auch bei Tuberkelbacillen in 1 mg mindestens 1 Milliarde Einzelindividuen enthalten sein muß; da jedoch die Infektiosität der gewöhnlich benutzten Glycerinbouillonkulturen für Meerschweinchen etwa bei Verdünnung bis zu $^1/_{10}$ bis $^1/_{100}$ Millionstel Milligramm aufhört, so darf man wohl annehmen, daß wenigstens unter diesen Bedingungen in der Tat ungefähr nur noch einzelne lebende und infektionsfähige Tuberkelbacillen in diesen Verdünnungen enthalten sind. Wenn in unseren Angaben die Zahl der Bacillen direkt in Tausenden oder Millionen angegeben wird, so sind das selbstverständlich nur annähernde Schätzungen.

Bei der Obduktion der Tiere wurden die Halsdrüsen stets sorgfältig frei präpariert; eine größere Zahl von Tieren mit charakteristischem Befund bewahrten wir in *Kaiserling*scher Flüssigkeit auf; sie gaben ein sehr übersichtliches Bild der experimentellen Halsdrüsentuberkulose.

Die *orale Infektion* (mit dem Ausdruck „orale Infektion" bezeichnen wir die Einträufelung einer Bacillen-Kochsalzlösung in den Mund, im Gegensatz zur „Fütterung", bei der die Bacillen dem Futter oder einem anderen Vehikel beigemischt sind) geschah in sehr einfacher Weise. Die gleichmäßige Bacillenemulsion wurde in einer 1 ccm fassenden Pipette oder in einer einfachen Spritze aufgesogen und ihr Inhalt tropfenweise auf die Mund- und Zungenschleimhaut geträufelt, während das Tier bei natürlicher Haltung des Kopfes fixiert und das Maul geöffnet gehalten wurde. Es wurde jedesmal gewartet, bis das Tier den Tropfen spontan heruntergeschluckt hatte, ehe eine neue Einträufelung der Bacillenflüssigkeit erfolgte.

Wir möchten an dieser Stelle gleich dem Einwand begegnen, daß bei dieser Art der Infektion des Versuchstieres Teile der Bacillenemulsion in die Lungen aspiriert werden konnten. Daß dies bei unzweckmäßigem Vorgehen und der üblichen Praxis möglich ist, wenn das Maul des Tieres durch einen durchbohrten Holzteil klaffend gehalten und durch ihn die Flüssigkeit unmittelbar in die Mund- und Rachenhöhle bei steiler Kopfhaltung geträufelt wird, steht außer Zweifel; denn dabei ist es dem Versuchstiere unmöglich, in normaler Weise zu schlucken. Die eingeführte Flüssigkeit, zumal, wenn es sich um größere Mengen handelt, kann in die Luftröhre aspiriert werden oder gar hineinfließen. Bei vorsichtigem Manipulieren und tropfenweiser Zufuhr, beim normalen Schluckakt, kommt jedoch eine Aspiration gewiß nicht in Frage; denn

dann wäre es bei jedem Bissen, bei jedem Trunk, der die Mundhöhle passiert, der Fall. Man sollte daher mit dem Einwand der Aspiration nicht so verschwenderisch umgehen. Daß man ihn in unsern Versuchen nicht machen kann, geht schon daraus hervor, daß die oral eingeführten Bacillen von dem Lymphgefäßsystem der Mundhöhle aufgenommen worden sind, wie das die weiteren Erörterungen beweisen. Er wird auch durch die wichtige Tatsache entkräftet, daß das bei oraler Infektion entstehende Krankheitsbild durchweg ein anderes ist als das der Tiere, die einen Bacillenspray eingeatmet hatten. Erwähnt sei hier nur noch, daß manche Tiere sich weigern, die ihnen verabreichte Bacillenemulsion zu schlucken. Sie scheinen einen Widerwillen gegen die schädliche Nahrung zu haben. Bei solchen Tieren muß man Geduld haben und warten, bis sie den Tropfen heruntergeschluckt haben.

*Schilderung des Lymphgefäßsystems des Kopfes und Halses.*

Bevor wir auf die Einzelheiten der Versuche näher eingehen, ist es notwendig, die Lymphbahnen, die als Infektionswege der Halsdrüsentuberkulose in Frage kommen, eingehend zu betrachten. Der Beschreibung haben wir die sorgfältige und wichtige Arbeit *Mosts* (*A. Most*: Die Topographie des Lymphgefäßapparates des menschlichen Körpers und ihre Beziehungen zu den Infektionswegen der Tuberkulose, Bibliotheca Medica, Abtl. C. Heft 21) zugrunde gelegt. Inwieweit diese auf die menschliche Pathologie zutreffende Schilderung auch für die gleichen Verhältnisse der von uns benutzten Versuchstiere gilt, wird später noch erörtert werden.

Bekanntlich kann sich die Halsdrüsentuberkulose in allen am Halse gelegenen Drüsen und Drüsengruppen entwickeln, vorzugsweise jedoch in den seitlichen, den cervicalen Lymphknoten. In die Schilderung sind also alle zuführenden Lymphbahnen sämtlicher Drüsengruppen des Halses mit ihren zugehörigen Quellgebieten einzubeziehen.

Als Drüsengruppen, die bei der Halsdrüsentuberkulose in Frage kommen, zählt *Most* folgende auf:

1. Die Submaxillardrüsen, gewöhnlich drei im Biventerdreieck gelegene Lymphknoten; öfter eingeschaltet in den Lymphstrom, der vom Gesicht zu den Submaxillardrüsen führt, sind die Wangen- und Gesichtslymphdrüsen.

2. Die Submentaldrüsen, zwei Gruppen, von je 1—2 Drüsenkörpern, die unterhalb des Kinnes in dem Raum liegen, der zwischen den vorderen Biventerbäuchen und aufwärts vom Zungenbein gelegen ist.

3. Die oberflächlichen Cervicaldrüsen. Ein bis drei, seltener mehr Drüsen, die am unteren Pol der Ohrspeicheldrüse zum Teil von der Speicheldrüsensubstanz umgeben und am vorderen Rande des Sternocleidomastoideus gelegen sind.

4. Aufwärts vor dem Ohr, in oder auf der Parotis liegt eine weitere Drüsengruppe, nämlich die Glandulae praeauriculares und die Gl. parotideae.



Das größte und wichtigste Drüsengebiet umfaßt:

5. Die tiefen Cervicaldrüsen. Zahlreiche Drüsenkörper, die entlang der Vena jugularis interna und communis liegen, und die sich lateralwärts auf den Scalenis bis zum Cucularisrand erstrecken.

Die tiefen Cervicaldrüsen bilden eine mediane und laterale Gruppe. Die erstere zieht der Vena jugularis entlang. „Ein typischer Knoten dieser Gruppe liegt am oder im Winkel, den die Vena facialis anterior mit der Jugularis interna am Zusammenfluß zur Jugularis communis bildet[1]).“

6. Die Supraclaviculardrüsen; abwärts vom Omohyoideus im Supraclaviculardreieck.

Endlich sind bei der Halsdrüsentuberkulose seltener zwei Gruppen befallen:

7. Die retropharyngealen und

8. die prälaryngealen Drüsen.

Allen diesen Drüsen fließt Lymphe aus den verschiedenen Teilen des Kopfes und des Halses zu. Für unsere Versuche conjunctivaler und oraler Infektion werden wir erstens die Topographie der Lymphbahnen des äußeren Auges, der Lider und der Conjunctiven, zweitens die der Schleimhäute des oberen Verdauungstraktus und drittens gleichzeitig die Lymphbahnen des oberen Respirationstraktus, also auch der Nasenhöhle usw. in den Kreis unserer Betrachtung ziehen müssen. Sie alle spielen als Infektionswege der Tuberkulose eine große Rolle.

1. Die Lider- und die Conjunctivalschleimhaut führen ihre Lymphe sowohl zu den maxillaren, als auch zu denen der Ohrspeicheldrüse und oberflächlichen cervicalen Drüsen. Die tiefen cervicalen sind auch hier die zweite Etappe (*Most*).

2. Die Lymphbahnen des Naseninnern:

Aus dem obersten Teil des Naseninnern und vom Naseneingange aus verlaufen sie zusammen mit den Lymphgefäßen der äußeren Nase:

a) zu den im Biventerdreieck gelegenen Drüsen der Submaxillargegend, wobei mitunter die Wangenlymphdrüsen in ihrem Verlauf eingeschaltet sind;

b) auch zu den am unteren Zipfel der Ohrspeicheldrüsen und am vorderen Kopfnickerrande gelegenen Glandulae cervicales.

Der Hauptstrom der Lymphe aus dem Naseninnern fließt nach hinten den Choanen zu, entlang der seitlichen Pharynxwand zu den seitlichen Retropharyngealdrüsen. Zusammen mit den Lymphstämmen der seitlichen und hinteren Rachenwand gelangen die Gefäße entweder durch die Retropharyngealdrüsen hindurch oder an ihnen vorbei hinter dem Gefäßnervenstrang entlang zu den tiefen Cervicaldrüsen, die lateral der Jugularis interna und Jugularis communis ihren Sitz haben und weiterhin zu den lateral auf den Scalenis befindlichen Drüsen (seitliche Gruppe der tiefen Cervicaldrüsen nach *Most*).

3. Die Lymphbahnen der Mundhöhle führen ähnlich wie die des Naseninnern die Lymphe nach vorn:

a) zum Submaxillargebiet und

b) zu den oberflächlichen Cervicaldrüsen.

Nur aus dem Hauptteil der Zunge und aus dem hinteren Teile der Mundhöhle richtet sich der Lymphstrom nach hinten, lateral und abwärts, zu denselben Bahnen, welche von der Tonsillenbahn herstammen und gelangen mit ihnen zu der vorderen Gruppe der tiefen Cervicaldrüsen, speziell zu denen, welche nächst dem Zusammenfluß der Vena facialis anterior und Vena jugularis interna liegen.

---

[1]) *Most*, Bibl. Med., Abt. C, Heft 21, S. 9.



4. Die Lymphbahnen der Schleimhaut des Rachens. Für unsere Untersuchungen ist wichtig, daß von der Tonsillen- und Rachengegend zahlreiche Gefäße hinter dem Biventerdreieck hinab unmittelbar zu der vorderen Gruppe der tiefen Cervicaldrüsen ziehen. Eine Drüse oder Drüsengruppe ist hier besonders hervorzuheben. Sie liegt in dem Winkel, der von der Vena facialis communis mit der Jugularis interna am Zusammenfluß zur Jugularis communis gebildet wird. Bei den Injektionsversuchen *Mosts* war sie regelmäßig als erste Station injiziert; ferner gleichzeitig die lateral an oder auf der Jugularis interna gelegenen Drüsen. Von ihnen direkt nach abwärts geht dann der Lymphstrom zu der Drüsenkette, die lateral von der Vena jugularis liegen. Sie endet ungefähr da, wo die Vena jugularis communis den Musculus omohyoideus kreuzt. Hier beginnt der Truncus cervicalis entweder als einzelner oder in mehreren Ästen geteilt. Er mündet am Winkel, den die Vena jugularis mit der Subclavia bildet in das Venensystem.

Eine Injektion der nahe am Bulbus jugularis gelegenen Subclaviculardrüsen gelang *Most* auf diesem direkten Wege nur selten und ganz ausnahmsweise.

Diesem anatomischen Befunde entsprechen auch die klinischen Erfahrungen bei der Halsdrüsentuberkulose, die fast stets in halber Halshöhe aufhört.

Da diese anatomisch wie klinisch sichergestellte Anordnung der Lymphwege und Drüsen der Tonsillen- und Rachengegend sich stets in typischer Weise wiederholte, ist es nach *Most* eine feststehende Tatsache: „Die Lymphbahnen der Rachen- und Tonsillengegend führen beim Menschen über die zahlreichen Glieder des tiefen cervicalen Drüsengebietes nur zum Truncus cervicalis und durch ihn zur Vene. Die Supraclaviculardrüsen gehören nicht zu ihrem regelmäßigen direkten Lymphgebiet. Direkte Lymphbahnen, welche vom seitlichen Halsgebiet zur Pleura oder zu den bronchialen Drüsen führen, existieren nicht[1])."

Es sei hier noch kurz auf das Lymphgefäßgebiet der Luftröhre und der Lunge eingegangen.

Von den Luftröhren und den Lungen strömt die Lymphe ebenfalls im Venenwinkel der Jugularis und der Subclavia zusammen. Zuweilen kann dabei eine der supraclavicularen Drüsen injiziert werden.

Das seitliche Halslymphgebiet und das tracheo-bronchiale Lymphgebiet berühren sich am Venenwinkel. Es ist jedoch eine Infektion der tracheo-bronchialen Drüsen von dem Tonsillen- und Rachengebiet rein anatomisch nicht möglich; denn ausnahmsweise stellen die supraclavicularen Drüsen das Mittelgebiet dar; auch wird ein retrograder Transport durch die Klappen verhindert. Die zahlreichen Anastomosen des Cervicalgebietes gestatten eine Rückstauung nicht.

Der Vollständigkeit halber sei hier noch angegeben: Die Lymphbahnen der Bauchhöhle gelangen in den Ductus thoracicus, der seinen Inhalt in die Vene abliefert. Ein kleiner Teil gelangt durch die retrosternalen Lymphwege dorthin. Es bestehen keine Verbindungen mit den Lungen und den tracheo-bronchialen Lymphdrüsen.

Wie verhält sich der Lymphgefäßapparat unserer hauptsächlichsten Versuchstiere, des Meerschweinchens und des Kaninchens?

[1]) Verhandl. der VI. Internat. Tuberkulose-Konf. S. 137.





Vergleichende Untersuchungen *Mosts* ergaben in allen Fällen übereinstimmende und unzweideutige Feststellungen. Es ist zwar auffallend, daß beim Meerschweinchen und Kaninchen der Lymphgefäßapparat eine einfachere Gliederung zeigt als beim Menschen, „die Drüsen sind im allgemeinen spärlicher, die Lymphbahnen selbst an Zahl geringer. Auch sind die Drüsen und Gefäße zum Teil klein und zart, letztere mitunter auch recht weit, aber stets klappenhaltig. Nur am Halse treten Größe und Kaliber der Drüsen und Gefäße öfters auffallend hervor, ohne daß die Zahl derselben wächst"[1]). *Aber prinzipielle Unterschiede zwischen der Topographie des Lymphgefäßapparates des Menschen, des Meerschweinchens und Kaninchens bestehen in keiner Weise.* Unterschiede in Zahl und Größe der Gefäße sind jedoch vorhanden. Da bei der Injektion der Farbstoff relativ rasch und leicht die wenigen Drüsen und die relativ weiten Gefäße durcheilt und bis in den kleinen Kreislauf vordringt, so folgert *Most* daraus, daß auch eine bacilläre Invasion diese wenigen Drüsenfilter rascher durchbrechen kann, um in kurzem Lauf ins rechte Herz und die Arteria pulmonalis zu gelangen, von der ein Übergreifen der Infektion auf die Lungenlymphbahnen und die bronchialen Drüsen erfolgen könne.

Im besonderen gestaltet sich der Lymphgefäßapparat bei den Versuchstieren in folgender Weise:

Am Unterkiefer beiderseits liegen je eine oder zwei Drüsen, in welche die Lymphbahnen der Mund- und Zungengegend einmünden. Aus diesen Drüsen führt gewöhnlich ein Gefäß den Lymphstrom weiter zu einer großen, tiefen Cervicaldrüse, die weiter abwärts an der Drosselvene gelegen ist, und aus ihr wiederum gelangt der Farbstoff durch ein einziges weites Rohr direkt zur Vene. Auf diesem Wege sind die anderen Halsdrüsen meist nicht injiziert. *Most* gelang es unschwer, aus der Lippenschleimhaut den Farbstoff bis an die Vene zu injizieren; durch erneuten Einstich in die Submaxillardrüsen konnte er ihn dann durch die tiefen Cervicaldrüsen ohne Schwierigkeiten bis in das rechte Herz, ja, bis in die Lungen fließen sehen, auf deren Oberfläche er sich in Form feinster blauer Verästelungen zeigte. Beim Menschen war dies nicht möglich, weil die vielgliederige Kette der tiefen Cervicaldrüsen mit ihren zahlreichen Gefäßverbindungen einen viel größeren Widerstand bietet. In den Tierversuchen blieben die tracheo-bronchialen Drüsen stets frei.

Soweit die Schilderung des Lymphgefäßapparates des Menschen, des Meerschweinchens und Kaninchens, soweit seine Kenntnis für das Verständnis der weiteren Ausführungen und Versuchsergebnisse notwendig ist.

---

[1]) Verhandl. der VI. Internat. Tuberkulose-Konf. S. 138.



*Die Beziehungen der experimentellen oralen und conjunctivalen tuberkulösen Infektion zum Drüsenapperat des Halses.*

Es war von Interesse, die am normalen Tiere festgestellten Lymphgefäßverhältnisse mit unseren, auf dem Wege der oralen Infektion erhaltenen pathologischen Befunden zu vergleichen. Decken sie sich mit den Feststellungen der Anatomen, insbesondere mit denen *Mosts*?

Wie aus den Protokollen (Tabelle 1 und 2) ersichtlich ist, können bei der oralen Infektion drei Drüsengruppen tuberkulös erkranken.

1. Die Submentaldrüsen,
2. die Submaxillardrüsen,
3. die tiefen Cervicaldrüsen.

Während die erkrankten Submentaldrüsen klein bleiben und die Größe einer kleinen Erbse nicht übersteigen, die Submaxillardrüsen über Bohnengröße nicht hinausgehen, pflegen die tuberkulösen Cervicaldrüsen meist stark vergrößert zu sein. Drüsen von Haselnußgröße sind häufig. Als typisch für die Halsdrüsentuberkulose des Meerschweinchens kann man die Erkrankung der tiefen Cervicaldrüsen bezeichnen. Durchweg ist jener typische Lymphknoten stark vergrößert, der am oder im Winkel liegt, den die Vena facialis anterior mit der Jugularis interna am Zusammenfluß zur Jugularis communis bildet. Beim Meerschweinchen ist es in der Mehrzahl nur dieser eine zur medialen Gruppe der tiefen Halslymphdrüsen zählende Lymphknoten, der tuberkulös erkrankt ist. In anderen Fällen nimmt die laterale Gruppe an der Erkrankung teil; sie liegt in einem solchen Falle meist unmittelbar dem medialen Knoten an. Die Hyperplasie ist gewöhnlich die gleiche wie die des medial gelegenen Knotens. *Man kann sagen, daß die starke Vergrößerung der tiefen Halslymphdrüsen der Halsdrüsentuberkulose des Meerschweinchens ihr charakteristisches Gepräge gibt.*

Beim Kaninchen sind es zwar dieselben Drüsen, die zu erkranken pflegen, die Vergrößerung erreicht bei diesem Versuchstier aber nicht so hohe Grade wie bei der Tuberkulose der tiefen Halslymphdrüsen des Meerschweinchens. Über Bohnengröße ging die Hyperplasie der Drüsen in unseren Versuchen selten hinaus. Ein solch charakteristisches Krankheitsbild wie beim Meerschweinchen zeigt also die Halsdrüsentuberkulose des Kaninchens nicht, dagegen ist die Verkäsung der Drüsen stärker.

*Die tiefen Halslymphdrüsen sind stets das letzte Glied in der Reihe der befallenen Drüsen bei einer Halslymphdrüsentuberkulose.* Diese setzt hier gewissermaßen scharf ab. Die in der Nähe gelegenen supraclavicularen, ebenso die tracheo-bronchialen Drüsen sind bei der durch orale Infektion entstandenen primären Halsdrüsentuberkulose unverändert.



*Übersichtstabelle.*

Sie gibt nicht nur eine Übersicht über die Tierversuche dieser, sondern auch der folgenden Arbeit *W. Baumgartens* „Vergleichende experimentelle Untersuchungen über die Entstehung der Lungentuberkulose durch Fütterung und Inhalation[1]).

| Datum des Versuchs | Tierart | Infektion mit Kultur | Dosis | Infektions-modus | Versuchstiere: Gesamtzahl | Davon: Tb. + | Davon: Tb. | inter-kur-rent + | über-lebend |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2. III. 21. | Meerschweinchen | Tb. human I | $^1/_{20}$ mg = 1—2 Mill. K. | Fütterung | 6 | 6 | . | . | . |
| 26. V. 21. | „ | Tb. Neugebauer. | $^1/_4$ mg = 8—9 Mill. K. | „ | 6 | 3 | 3 | . | . |
| 31. V. 21. | „ | Kultur v. 18. III. desgl. | $^1/_4$ mg = 8—9 Mill. K. | „ | 6 | 5 | . | . | 1 |
| 2. VII. 21. | Kaninchen | Tb. bovin. | $2^3/_7$ mg = 85 Mill. K. | „ | 2 | . | . | 2 | . |
| 2. VII. 21. | „ | „ | $2^3/_7$ mg = 85 Mill. K. | „ | 2 | 2 | . | . | . |
| 5. IX. 21. | „ | „ | $2^1/_2$ mg = 87,5 Mill. K. | „ | 4 | 2 | . | 1 | 1 |
| 18. V. 21. | Meerschweinchen | Tb. Neugebauer, Kultur v. 13. V. | $^1/_4$ mg = 8—9 Mill. K. | Conjunctivale | 5 | 5 | . | . | . |
| 13. VI. 21. | „ | „ „ 23. V. | $^1/_4$ mg = 8—9 Mill. K. | „ | 2 | 2 | . | . | . |
| 13. VI. 21. | „ | „ „ 23. V. | $^1/_{40}$ mg = 87 000 K. | „ | 2 | 1 | . | 1 | . |
| 13. VI. 21. | „ | „ „ 23. V. | $^1/_{400}$ mg = 80 000 K. | „ | 2 | 2 | . | . | . |
| 13. VI. 21. | „ | „ „ 23. V. | $^1/_{4000}$ mg = 8000 K. | Infektion | 2 | . | 2? | . | . |
| 6. VII. 21. | „ | Kultur v. 10. VI. | $^1/_4$ mg = 8—9 Mill. K. | „ | 1 | 1 | . | . | . |
| 5. X. 21. | „ | Tb. Ludwig, Kultur vom 22. IX. | $^1/_{14000}$ mg = 2500 K. | „ | 2 | 2 | . | . | . |
| 5. X. 21. | „ | desgl. | 13 Keime | „ | 2 | 2 | . | . | . |
| 29. VI. 21. | Kaninchen | Tb. Perlsucht | $^1/_1$ mg = 8—9 Mill. K. | „ | 6 | . | 6 | . | . |
| 26. VIII. 21. | „ | „ „ | ca. $^1/_3$ mg 10—11 Mill. K. | „ | 5 | 4 | . | 1 | . |
| 13. X. 21. | „ | Tb. bovin I | ? | „ | 3 | 2 | . | 1 | . |

[1]) Die Inhalationsversuche der Tab. II sind jedoch nicht in ihr aufgeführt.

*Tabelle I. Fütterungsversuche*

**Infektion durch tropfenweises Aufträufeln der Kulturverreibung aus einer Pipette**
**24 Stunden lang gefastet. Die Tiere wurden nach den angegebenen Zeiten getötet,**

| Nr. | Datum des Versuchs | Infektion mit: Stamm | Infektion mit: Dosis | getöt. n.? Tag. | Gewicht zu Beginn g | Gewicht zu Ende g | Kieferwinkeldrüsen: Gland. subment. und submaxill. | Halsdrüsen: Gland. cervical. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 (1) | 2. III. 1921 | Tb. human. Stamm I. | 0,5 ccm einer Aufschw. v. 10 mg Kultur i. 100 ccm Kochsalzlösung = 0,05 mg = 1,75 Mill. Keime | 49 | 320 | 370 | Kleinhaselnußgroß, gelbweiß, verkäst. | In dem Winkel zwischen Vena jugularis communis und Vena facialis liegt auf der linken Seite eine linsengroße, verkäste Drüse. |
| 2 (4) | | | | 49 | 340 | 330 | Ein aus 3 linsengr. Drüsen besteh. Paket, außerd. n. 1 kleinlinsengr. Drüse | Kleinbohnengroß, graurötlich, nicht verkäst. |
| 3 (5) | | | | 29 | 350 | — | Unregelmäßiges Paket. | Starke Vergrößerung mit beginnender Verkäsung. |
| 4 (6) | | | | † 276 | 320 | — | Erbsengroß, zum Teil verkäst. | Bohnen- bis kirschkerngroß, in einem Paket zusammenliegend mit vereinzelten verkästen Herden. |
| 5 (3) | | | | † 166 | 340 | — | Kleinerbsengroß. | Außerordentlich stark vergrößert, besonders rechts, bis über Haselnußgröße, zum Teil verkäst, miteinander verwachsen. |
| 6 (2) | | | | † 219 | 395 | — | Erbsengroß, verkäst. | Auf der linken Seite eine walnußgroße Drüse. |
| 7 (433) | 26. V. 1921 | Tb. human. Neugebauer. Glycerink. v. 18. III. 21 | 0,25 ccm einer Verreibung v. 10 mg Kultur in 5 ccm Kochsalzlös. = 8,75 Mill. Keimen. | 25 | 225 | 290 | 2 linsengroße grauweiße Drüsen. | — |
| 8 (435) | | | | 35 | 230 | 330 | 2 linsengroße Drüsen. | Linsengroß. |
| 9 (434) | | | | 152 | 260 | 540 | — | — |
| 10 (436) | | | | 152 | 310 | 620 | — | — |
| 11 (432) | | | | 191 | 240 | 630 | Kaffeebohnengroß. | Links 1 überbohnengroße, rechts 2 haselnußgroße Drüsen. |
| 12 (431) | | Tb. human. | | 200 | 240 | ? | — | — |
| 13 (378) | 31. V. 1921 | wie bei Versuch vom 26. V. 1921 | wie bei Versuch vom 26. V. 1921 | 23 | 210 | ? | Erbsengroß. | 2 harte bohnengroße Drüsen auf der linken Seite, 1 gleichgroße auf der rechten Seite. |
| 14 (436) | | | | 31 | 430 | 410 | Kirschkerngroßes Drüsenpaket. | Links 1 linsengroße, rechts 1 bohnengroße Drüse. |
| 15 (428) | | | | 154 | 240 | ? | Ein walnußgroßes Paket aus 2 großen Drüsen. | Vor der Trachea nach der linken Seite zu eine haselnußgroße Drüse. |
| 16 (429) | | | | 166 | 380 | ? | — | 3 kirschkerngroße Drüsen. |
| 17 (377) | | | | 222 | 240 | 430 | — | — |



*an Meerschweinchen.*

**auf die Zunge des fixierten Tieres. Die Tiere 13 bis 17 (Versuch am 31.V. 1921) haben**
**und zwar Tier 1—6 und 9—10 durch Nackenschlag, die anderen durch Chloroform.**

| Lungen- und Bronchialdrüsenbefund | Milz und andere Organe | Diagnose |
|---|---|---|
| — | — | Hyperplasie und Verkäsung der Unterkieferwinkel- und Halsdrüsen. |
| — | — | Hyperplasie der Unterkieferwinkel- und Halsdrüsen. Lymphoides Stadium. |
| — | — | Wie 2. Lymphoides Stadium mit beginnender Verkäsung. |
| Lungen hepatisiert, mit gelbweißen, konfluierenden Herden sehr stark durchsetzt. | Milz: Um 1/3 vergrößert, mit gelbweißen Herden durchsetzt, Leber: vereinzelte Herde, bes. am Rande. | Tuberkulose der Unterkieferwinkel- und Halsdrüsen, der Lungen, Milz und Leber. |
| Lungen: Rechter Unterlappen hepatisiert, die übrige Lunge mit linsengroßen, glasigen Tuberkelknötchen, die zum Teil konfluieren und das Lungengewebe hepatisieren, durchsetzt. | Milz: Stark vergrößert mit zahlreichen, zum Teil verkästen Knötchen. Leber: Zahlreiche kleine glasige Knötchen. | Wie 4. |
| Lungen: Mit zahlreichen, weißgelblichen konfluierenden Herden durchsetzt, hepatisiert. | Milz: Sehr zahlreiche dunkelrote konfluierende Herde, vereinzelte verkäste Knötchen. | Wie 4. |
| Rechte Lunge: Am Rande des Oberlappens nahe dem Hilus ein graurötlicher, hepatisierter Herd mit scharfen Rändern, an welchen 12—15 weißliche kleinste Knötchen sitzen. Ein ebensolcher kleinerer Herd an der Hinterseite des Mittellappens. Linke Lunge: Ein gleicher Herd in der Nähe des Hilus. | Milz: Groß, dunkel, mit hirsekorngroßen, weißlichen Knötchen. | Hyperplasie der Unterkieferwinkeldrüsen. Rote hepatisierte Lungenherde in der Nähe des Hilus. Tuberkulose der Milz. |
| Dunkelrote indurierte Herde im unteren Teil des l. Oberlappens und im rechten Mittellappen. | Milz: Klein, mit reichlich Knötchen. | Hyperplasie der Halsdrüsen. Tuberkulose der Milz, beginnende Tuberkulose der Lungen. |
| — | — | Kein pathologischer Befund. |
| — | — | Wie 9. |
| Lungen gleichmäßig mit gelblich braunen glasigen, stecknadelkopf- bis kleinlinsengroßen Knötchen durchsetzt, welche zum größten Teile konfluieren. | Milz: Sehr groß: 6 : 2,5 : 0,5, mit Knötchen völlig durchsetzt. Leber: Miliare Knötchen in großer Anzahl. | Hyperplasie der Halsdrüsen. Ausgebreitete Tuberkulose der Milz und Lungen, geringere der Leber. |
| — | — | Kein pathologischer Befund. |
| Im linken Unterlappen ein 5 : 3 mm großer grauroter hepatisierter Herd. Weitere Herde beiderseits in der Nähe des Hilus. | Milz: Klein, ohne Veränderungen. In der Radix mesent. 2 überbohnengroße Drüsen. | Hyperplasie der Halsdrüsen. Rote Hepatisation d. Lunge. Hyperplasie von 2 Mesenterialdrüsen. |
| Vereinzelte dunkelrote Herde mit kleinsten Knötchen. | Milz: Groß, mit vereinzelten Knötchen am Rande. | Hyperplasie der Halsdrüsen. Rote Hepatisation der Lunge mit beginnend. Knötchenbildung. Beginnende Tuberkulose der Milz. |
| Zerstreute kleine dunkelgraue, leicht erhabene Knötchen mit etwas hellerer Peripherie. | Milz: Groß, dick, mit gelblichen Knötchen reichlich durchsetzt. | Starke Hyperplasie der Halsdrüsen. Tuberkulose der Lunge und der Milz. |
| gleichmäßige dunkelrote Verfärbung der Lungen. | — | Hyperplasie der Halsdrüsen. |
| Vereinzelte runde bis erbsengroße Flecken von schmutzig roter Farbe. Der rechte Unterlappen ist an seinem Unterrande in 5 mm Ausdehnung mit der Pleura costalis sehnenartig verwachsen. | — | Herdweise rote Hepatisation der Lungen. |

*Tabelle II. Fütterungsversuche*

**Infektion durch tropfenweises Aufträufeln der Kulturver-**

| Nr. | Datum des Versuchs | Injektion mit: Stamm | Injektion mit: Dosis | Getöt. n. ? Tag. | Gewicht zu: Beginn | Gewicht zu: Ende | Kieferwinkeldrüsen: Gland. subment. und submaxill. | Halsdrüsen: Gland. cervical. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 (340) | 2. VII. 1921 | Tb. bovin. Schlachthof. v. 7. VI. | 0,5 ccm einer Verreibung von 10 mg Kultur in 2 ccm NaCl-Lösung = 85 Mill. Keime | † 29 | 2480 | ? | — | — |
| 2 (341) | | | | † 144 | 3070 | ? | — | — |
| 3 (342) | | | | † 116 | 1000 | ? | — | Beiderseits nicht ganz bohnengroß. |
| 4 (343) | | | | † 144 | 870 | 2730 | — | — |
| 5 (1) | 5. IX. 1921 | Tb. bovin. Perlsucht I. v. 5. 8. | 2 ccm NaCl-Lösung = 87,5 Mill. Keime | † 14 | 1760 | ? | — | — |
| 6 (2) | | | | † 104 | 1780 | ? | — | Rechts dicht unterhalb des Kiefers eine über[illegible]große, vereiterte Drüse, daran anschließend [illegible] ebenfalls vereiterte von Bohnengröße. |
| 7 (3) | | | | † 150 | 1320 | ? | Zwei bohnengroße, z.T. verkäste Drüsen. | Die ebenfalls verkästen Halsdrüsen der linken Se[illegible] bilden ein längliches, schmales Paket von [illegible] Länge und 0,5 cm Breite. |

Dies Verhalten beweist, daß zwischen diesen Drüsengruppen und den Halslymphdrüsen Verbindungen nicht bestehen. Eine Fortleitung des Lymphstromes von den tiefen Halslymphdrüsen zu den Lymphdrüsen der Trachea und der Lungen ist also nicht möglich.

*Unsere durch die orale Infektion von Tuberkelbacillen erzielten pathologischen Lymphdrüsenveränderungen entsprechen also durchaus den Befunden, die Most bei seinen Injektionsversuchen über den Weg der Lymphe der Mundhöhle, der Tonsillen und der angrenzenden Rachenpartien erhalten hat. Die pathologischen Befunde stimmen mit den Ergebnissen der normalen Anatomie überein.*

Noch eine andere wichtige Tatsache von allgemeinerer Bedeutung haben unsere Versuche festgestellt. Bei oraler Infektion oder Fütterung kann schon *der obere Teil des Verdauungstraktus, also die Schleimhaut der Mund- und Rachenhöhle, an der Resorption von Tuberkelbacillen in hervorragender Weise unter gewissen Bedingungen beteiligt sein*; die Bacillen können bereits an diesen Stellen ihren Eingang in den Organismus finden. Die Aufnahme der Bacillen durch die Lymphbahnen der Mund- und Rachenschleimhaut geschieht in durchaus natürlicher



*an Kaninchen.*

**reibung aus einer Pipette auf die Zunge der fixierten Tiere.**

| Lungen- und Bronchialdrüsenbefund | Milz und andere Organe | Diagnose |
|---|---|---|
| — | — | Nichts von Tuberkulose. Tod an Seuche. |
| — | — | Wie 1. |
| ungen durchsetzt mit gelbweißlichen, scharf abgesetzten, leicht erhabenen Knötchen. | Milz o. B. Echinokokken. | Keine Hyperplasie der Halsdrüsen. Isolierte Tuberkulose der Lungen ohne Beteiligung anderer Organe. |
| den Pleurahöhlen ziemlich reichlich Exsudat. Beide Lungen fast vollständig hepatisiert, von gelbweißer Farbe. Dazwischen rote Bezirke von normalem Lungengewebe. | Milz o. B. Stecknadelkopfgroße Knötchen unter der Nierenoberfläche. | Keine Hyperplasie der Halsdrüsen. Tuberkulose der Lungen und Nieren. |
| — | Coccidiose. | Coccidiose. |
| ungen: Stark durchsetzt von erbsengroßen verkästen Knötchen. | Milz: o. B. Dünndarm stark aufgebläht infolge Verschluß durch Darmverschlingung. | In Eiterung übergegangene Tuberkulose der Halsdrüsen und Lungen. Tod an Darmverschluß. |
| eiß- und rötlich gefleckt (Seuche). Außerdem zahlreiche Tuberkelknötchen. | Milz o. B. Nieren: unter der Kapsel ziemlich reichlich erbsengroße, weißgraue Knötchen. | Tuberkulose der Halsdrüsen, der Lungen und Nieren. Außerdem Stallseuche. |

Weise; es handelt sich um einen Vorgang, der an den betreffenden Schleimhäuten sichtbare Spuren nicht hinterläßt, und der erst dann pathologische Veränderungen in dem zugehörigen Lymphgefäßsystem erzeugt, wenn die Bacillen mit der Lymphe in die entsprechenden Lymphbahnen geschafft worden sind. Dieses starke Resorptionsvermögen des Lymphgefäßsystems der Mund- und Rachenschleimhaut war bisher in seiner Gesetzmäßigkeit kaum bekannt, seine Bedeutung bei der Entstehung der Fütterungstuberkulose stark unterschätzt. Die meisten Untersucher, die über die Entstehung der Lungentuberkulose auf dem Wege der Fütterung geschrieben, haben die große Bedeutung der Mund- und Rachenhöhle als Eingangspforte für die Tuberkelbacillen entweder gar nicht oder nur unvollkommen gewürdigt. Für die meisten fängt die Resorption und die Aufnahme der Tuberkelbacillen erst im unteren Abschnitt des Verdauungskanals auf der allgemein anerkannten Resorptionsfläche der Dünndarmschleimhaut an.

Wir wollen nicht unterlassen zu erwähnen, daß doch schon vereinzelte interessante Beobachtungen vorliegen, die zwar nicht systematisch und mit bestimmten Mengen von Reinkulturen angestellt





sind, die aber doch darauf hindeuten, daß auch bei Meerschweinchen nach Aufnahme kleiner Mengen von Tuberkelbacillen vom Munde aus zum Teil sehr langsam verlaufende, an Skrofulose erinnernde Drüsenerkrankungen entstehen können. (*Wolff-Eisner* zit. bei *Römer*. Beiträge zur Klinik der Tuberkulose **17**, 358; ferner *Römer* selbst, ebendort **22**, 265; *Hara*, in *Baumgarten*, Arb. a. d. Gebiete der path. Anat. u. Bakt. **7**, 436; *Weber* und *Titze*; Tub.-Arb. a. d. Reichsges.-Amt H. 10.)

Erfolgreiche Fütterungsversuche mit Tuberkelbacillen machte auch *Weleminsky*[1]) bei Kaninchen und Meerschweinchen. Die Tiere erhielten 8—10 Tage ein Futter, das mit der Bacillenaufschwemmung getränkt worden war, oder es wurde die Aufschwemmung der Milch zugesetzt. Bei mehreren Kaninchen entstand sowohl eine Erkrankung des Darm- wie des Respirationstraktus und bei einem anderen Teil der Tiere wurde durch die Fütterung nur der Respirationstrakt und nicht der Verdauungskanal infiziert. Bei sämtlichen Meerschweinchen war sowohl der Darm wie der Respirationstraktus mit den Lymphdrüsen erkrankt. Nach seinen Versuchen erscheint *Weleminsky* die Annahme berechtigt, „daß durch Verfütterung von tuberkulösem Material unter annähernd natürlichen Verhältnissen durchaus nicht der Darmtrakt (Darm- und Mesenterialdrüsen), sondern vor allem der Respirationstrakt (Bronchialdrüsen und Lungen) gefährdet ist".

Warum der experimentelle Beweis für das starke Aufsaugungsvermögen der Mund- und Rachenschleimhaut, zumal für den Tuberkelbacillus, bisher nicht geliefert worden ist, bedarf einer näheren Erklärung; denn es ist immerhin auffallend, daß es uns sehr häufig gelungen ist, durch eine orale Infektion das typische Bild einer Halslymphdrüsentuberkulose bei Meerschweinchen und Kaninchen zu erzeugen, während andere Untersucher bei Fütterungsversuchen nur Mißerfolge hatten.

Um auf mehr natürlichem Wege eine intestinale Infektion mit Tuberkelbacillen hervorzurufen, sind, wie *Flügge*[2]) bemerkt, unzählige Versuche angestellt. Wenn es oft gelungen sei, ein positives Resultat zu erzielen, so sei das doch stets dem Umstande zu verdanken gewesen, daß außerordentlich große Dosen (von 100 mg Kulturmasse) zur Verwendung kamen. *Flügges*, *Findels*, *Reichenbachs* Versuche fielen jedoch stets negativ aus, wenn kleinere und mittlere Dosen gebraucht wurden. Besondere Sorgfalt wurde von ihnen auf eine sehr gleichmäßige Aufschwemmung und eine feine Verteilung im flüssigen oder breiigen Fütterungsmaterial, meist dünnem Mohrrübenbrei, gelegt.

[1]) Berliner klin. Wochenschr. 1903, Nr. 37.

[2]) Referat auf der VI. Internat. Tub.-Konf. S. 53. Bericht von *Pannwitz* Berlin-Charlottenburg. Rud. Mosse.



Meerschweinchen konnten regelmäßig erst mit Dosen, die 10 mg Kultur und mehr betrugen, infiziert werden. Ohne jeden Erfolg verlief die Infektion bei Kaninchen, selbst mit 180 mg, bei Hunden mit 172 mg, bei jungen Ziegen mit 25 mg. Wo bei Meerschweinchen eine positive Infektion erfolgt war, fand sich bei der Sektion zwischen dem 12. und 20. Tage nach der Fütterung nur eine Schwellung der Mesenterialdrüsen; der erste Beginn einer Lungenerkrankung wurde erst zwischen dem 46. und 62. Tage festgestellt.

*Flügge* erwähnt dann die Versuche von *Strassner*[1]), *Reichenbach*, *Alexander*. Ersterer erzielte mit mittleren Dosen von $^1/_5$ mg (gleich acht Millionen Bacillen) aufwärts eine positive Infektion, wenn er sie einmalig direkt in den Magen injizierte. Die gleiche Menge war aber auch bei der Verfütterung ausreichend, wenn dies öfter geschah, während eine geringere Zahl von Wiederholungen ohne Ergebnis blieb. Wurden Meerschweinchen z. B. 5 mal 0,2 mg oder 10 mal 0,5 mg Kultur gereicht, so erkrankten sie nicht, ebensowenig Kaninchen nach 5 mal 10 mg Perlsucht, Hunde nach 40 mal 4 mg Perlsucht. Anders verhielten sich die Meerschweinchen. Deutliche Tuberkulose zeigte sich bei solchen, denen 20 mal 1 mg oder solche, denen 70 mal 0,1 mg gegeben worden war.

*Flügge*[2]) und seine Mitarbeiter ziehen aus diesen Versuchen den Schluß, daß ein rascher Übergang von Tuberkelbacillen aus dem Darm in die Lunge nicht stattfindet. Wie aus den genauen Untersuchungen *Mosts* hervorgehe, sei die hier angeblich bestehende Lymphgefäßverbindung offenbar nicht vorhanden. „Verfütterung von Tuberkelbacillen *kann* zweifellos zur Tuberkulose führen, jedoch nur auf dem Wege, daß zunächst die Mesenterial- (bzw. Portal-) Drüsen erkranken und daß erst relativ spät eine Lungenaffektion sich anschließt; meist wohl erst dann, wenn Verkäsung der Drüsen und Einbruch in die Blutbahn stattgefunden hat. Ferner ist von größter Wichtigkeit, daß relativ sehr große Dosen zur Infektion auf intestinalem Wege erforderlich sind; bei einmaliger Aufnahme ist diese Dosis enorm; nur bei sehr häufig und regelmäßig wiederholter Einverleibung können auch mittlere Dosen infizierend wirken.“ *(Flügge)*.

*Bartel*[3]) fütterte Meerschweinchen und Kaninchen mit dem Typus humanus einmalig und auf natürliche Weise; er hatte aber ebenso wie andere Experimentatoren stets negative Sektionsbefunde zu verzeichnen. Makroskopisch tuberkulöse Veränderungen konnte er bei seinen Fütterungstieren nicht feststellen. Wenn er aber die der Infektion ausgesetzten Organe nicht nur mikroskopisch, sondern auch kulturell untersuchte und sie auf andere Versuchstiere überimpfte,

[1]) Siehe Fußnote 2, S. 490.
[2]) Siehe Fußnote 2, S. 490.
[3]) Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 10.



erhielt er wesentlich andere Resultate. Mikroskopisch konnte er öfters in dem lymphatischen Gewebe seiner Fütterungstiere „der produktiven Komponente der Tuberkelbacillenwirkung zuzuschreibende Veränderungen — Epitheloidzellentuberkel — sowie auch isolierte Riesenzellen, zumeist auch Tuberkelbacillen", nachweisen. Im Gegensatz zur manifesten Tuberkulose mit spezifischen Veränderungen bezeichnet er dieses als das „lymphoide Stadium", in welchem die Drüsen lymphocytäre Hyperplasie zeigen oder anscheinend unverändert sind. Die Existenz eines solchen lymphoiden Stadiums lasse sich auch für den Menschen nachweisen. Eine derartige Tuberkulose trage den Charakter einer kryptogenetischen Infektion.

Worauf sind diese Unterschiede unserer Versuche und der anderer Untersucher zurückzuführen?

Offenbar einmal darauf, daß wir *frische humane und bovine Stämme von originaler Virulenz* zu den Versuchen benutzten, ein wichtiges Moment, auf das wir bereits oben aufmerksam machten; in der Hauptsache war aber der positive Ausfall einer manifesten Halsdrüsentuberkulose wohl auf die *Applikationsweise* des Infektionsmaterials zurückzuführen. Es ist sicherlich nicht gleichgültig, ob man eine Kochsalztuberkelbacillenemulsion in die Mundhöhle der Versuchstiere bringt, die dort eine geraume Zeit verweilt und in innigem Kontakt mit der Mundschleimhaut bleibt, bis sie heruntergeschluckt wird, ob man die Tuberkelbacillen dem Futter beimischt, oder die Bacillen in irgendein festes Vehikel einschließt und sie so verfüttert. In ersterem Falle können die Lymphbahnen der Mund- und Rachenschleimhaut die Bacillen direkt aufnehmen, da sie gewissermaßen in einen resorptionsfähigen Zustand versetzt sind, im letzteren Falle ist hierzu gar keine oder für vereinzelte Bacillen nur eine kurze Gelegenheit vorhanden, in die Lymphbahnen resorbiert zu werden. Die Tuberkelbacillen werden mit der Nahrung sofort verschluckt, sie kommen dann in den Magen, wo wahrscheinlich ein großer Teil durch die Salzsäure vernichtet wird; einen Beweis hierfür haben *Jos. Koch* und *B. Möllers* erbracht, als sie Versuchstieren die Bacillen direkt in den Magen brachten. Die Folge war, daß sich bei Verwendung wenig virulenter Kulturen entweder gar keine oder nur in einzelnen Fällen eine manifeste Tuberkulose entwickelte. Ähnliche Verhältnisse liegen wohl vor beim Genuß der Milch tuberkulöser Haustiere. Die Milch, in der die Tuberkelbacillen enthalten sind, wird schnell in den Magen befördert, wo ein Teil abgetötet, während ein anderer Teil von den Chylusgefäßen des Darmes aufgenommen wird und eine Mesenterialdrüsentuberkulose erzeugt. So entsteht bei Kindern die Mesenterialdrüsentuberkulose durch den länger fortgesetzten Genuß der Milch perlsüchtiger Kühe, eine Erkrankung, die ja in vielen Fällen auf einer Infektion mit

dem Typus bovinus beruht. So sind auch die erfolgreichen Versuche *Calmettes* bei der Fütterung perlsüchtiger Milch an jungen Ziegen zu erklären.

Will man also eine Halsdrüsentuberkulose erzeugen, so müssen die Lymphbahnen der Mund- und Rachenhöhle die Möglichkeit haben, die Bacillen aufnehmen zu können, im anderen Falle werden sie verschluckt, zum Teil im Magen vernichtet, nur ein verhältnismäßig kleiner Teil gelangt in den Darm, in dem wiederum ein Teil zugrunde geht. So ist nur einem Restteil der verfütterten Bacillen die Möglichkeit gegeben, in die Mesenterialdrüsen zu gelangen. Auf diese Weise erklärt es sich, warum zur Erzeugung einer Fütterungstuberkulose weit größere Mengen von Bacillen erforderlich sind als bei subcutaner oder anderer Infektion.

Auch das haben unsere Versuche gezeigt, daß die Aufnahme der Bacillen durch die Lymphbahnen des oberen Teiles des Verdauungskanales *außerordentlich schnell* vor sich geht, und daß schon eine verhältnismäßig geringe Anzahl von Bacillen genügt, um das Bild der Halsdrüsentuberkulose zu erzeugen.

*Nicht die Größe der Infektionsdosis, wie Flügge, Findel, Reichenbach u. a. annehmen, ist also das entscheidende Moment für den Erfolg einer Fütterungstuberkulose, sondern der von uns geschilderte Infektionsmechanismus*, die Möglichkeit, daß in den oberen Teil des Verdauungstraktus gelangte Tuberkelbacillen von den entsprechenden Lymphbahnen aufgenommen werden können; das geht aus unseren Versuchen klar hervor. Eine Halsdrüsentuberkulose, eine sekundäre Lungenerkrankung entwickelte sich bei unseren Tieren mit weit geringeren Dosen, wie sie andere Untersucher zur Anwendung brachten. In den Versuchen vom 2. III. 21 wurden sechs Meerschweinchen von uns oral infiziert. Die Infektionsdosis betrug $^1/_{20}$ mg (= $1^3/_4$ Millionen Keime), sämtliche sechs Tiere bekamen eine Halsdrüsen- und eine Lungentuberkulose. Das sind doch erheblich geringere Dosen, wie die von *Flügge* und *Findel* angegebenen, die Meerschweinchen regelmäßig erst mit Dosen von 10 mg und mehr infizieren konnten.

Bei Kaninchen verlief die Infektion mit $2^1/_2$ bis 3 mg erfolgreich, während *Alexander* bei Kaninchen selbst mit 180 mg keinen Erfolg hatte.

*Für die Entstehung der menschlichen, besonders der kindlichen Halsdrüsentuberkulose oder Skrofulose sind unsere Versuche von erheblicher Bedeutung; denn die von uns angewandte Applikationsweise ist der Schmutz- und Schmierinfektion durchaus ähnlich.* Ihre Entstehung haben wir uns so zu denken, daß Tuberkelbacillen auf die Mundschleimhaut des Kindes gelangen, eine Zeitlang dort liegen bleiben, bis die Lymphbahnen sie aufnehmen und sie den Submental- und Submaxillar-, vor allem aber den tiefen Halslymphdrüsen zuführen. Auf die Mundschleimhaut werden die



pathogenen Keime in erster Linie durch die Hände gebracht. Das Kind pflegt ja mit Vorliebe seine Finger in den Mund zu stecken; das ist nicht nur bei den Kindern der ärmeren Bevölkerungsschichten der Fall, wo die Reinlichkeit überhaupt viel zu wünschen übrigläßt, und wo die Tuberkulose ihre meisten Opfer fordert. *Wenn man bedenkt, ein wie häufiges Krankheitsbild die Halsdrüsentuberkulose im Kindesalter ist, so muß man daraus den Schluß ziehen, daß die Schmutz- und Schmierinfektion mit Tuberkelbacillen doch ein recht häufiges Ereignis ist.*

In zweiter Linie ist es die Milch eutertuberkulöser Kühe, mit der die Tuberkelbacillen in den kindlichen Mund befördert werden. Wenn auch der bei weitem größte Teil der Keime sofort verschluckt wird und in den Magen gelangt, so wird es doch sicherlich auch vorkommen, daß mit den Milchresten Bacillen auf der Mundschleimhaut liegenbleiben, die dann von den Lymphbahnen aufgenommen werden können. *Im Einklang damit steht die Tatsache, daß die kindliche Halsdrüsentuberkulose verhältnismäßig häufig auf den Perlsuchtbacillus zurückzuführen ist.* Unter den Krankheitsbildern, die der Typus bovinus beim Menschen hervorruft, steht die Halsdrüsentuberkulose an zweiter Stelle.

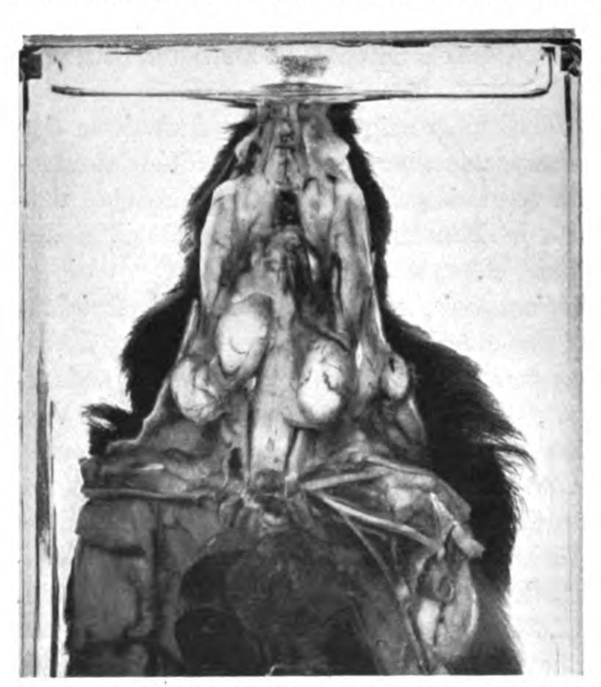


Abb. 1. Meerschweinchen Nr. 38 (398) (Tab. V, Nr. 3). Conjunctivale Infektion, 3 Monate später getötet. Halsdrüsen frei präpariert. Die Abb. zeigt die starke Hyperplasie der tiefen Halsdrüsen, die in diesem Falle als mediale und laterale Gruppe vorhanden sind. Präparat in Kaiserling konserviert.

Wenn es uns gelungen ist, schon durch eine einmalige orale Infektion in der von uns angegebenen Weise eine Halsdrüsentuberkulose zu erzeugen, so wird das bei der Schmutz- und Schmierinfektion im Kindesalter um so eher der Fall sein, da die Infektion hier öfter, über einen längeren Zeitraum, ja vielleicht täglich stattfindet. Auf Grund dieser Überlegungen können wir daher die Ansicht *Flügges* nicht teilen, die er in seinem Referat „Ätiologie der Tuberkulose" auf der 6. Internationalen Tuberkulosekonferenz in Wien vom 19.—21. IX. 1907 S. 56 über die Bedeutung der Schmierinfektion wiedergegeben hat: „Offenbar kann sich nämlich die sog. Schmierinfektion der Kinder

vorzugsweise nur bei einer ärmeren und unreinlichen Bevölkerung häufen, wo weder die Erwachsenen vor dem Verunreinigen des Fußbodens mit Sputum noch die Kinder vor dem Berühren dieser Sputa und dem Einbringen der beschmutzten Finger in den Mund zurückschrecken. Wo nur etwas Reinlichkeit, Erziehung und ‚Kinderstube' vorhanden ist, da muß die sog. Schmierinfektion ganz zurücktreten."

*Die Halsdrüsentuberkulose läßt sich aber nicht nur durch eine Infektion der Mundschleimhaut, sondern auch durch eine solche von der Augenbindehaut erzeugen.* Ja, es scheint sogar, daß die conjunctivale Infektion mit ebenso großer Sicherheit zu einer Erkrankung der Halslymphdrüsen führt als die orale. Auch fällt die Erkrankung der Drüsen bei der Infektion der Augenbindehaut meist stärker aus; das ist besonders beim Meerschweinchen der Fall. (Tab. III, IV, und V).

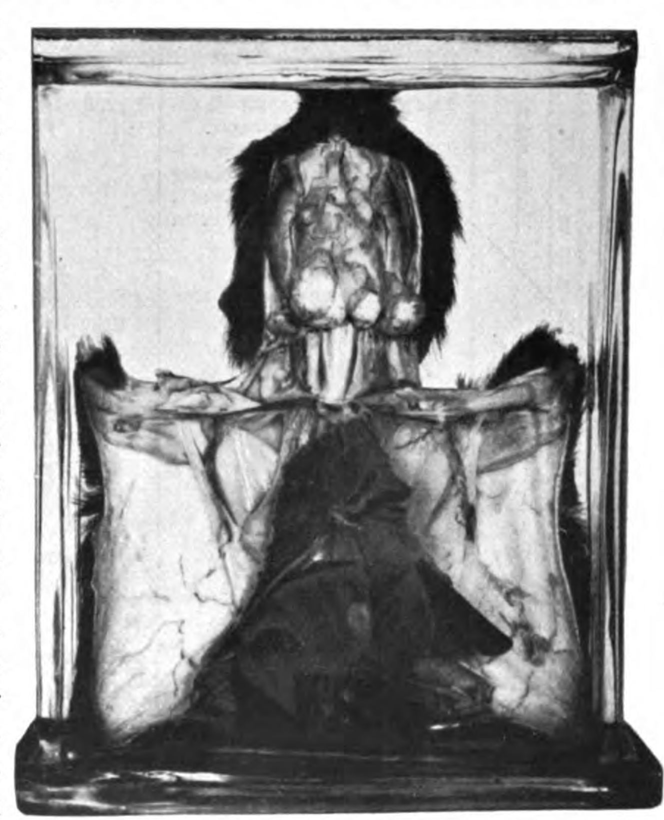


Abb. 2. Meerschweinchen Nr. 3 (11) (Tab. III). Conjunctivale Infektion, 40 Tage später getötet. Hyperplasie der Submental-Submaxillar- und der tiefen Halslymphdrüsen. Die Halsdrüsentuberkulose schneidet hier gegen die untere Hälfte des Halses scharf ab. Präparat in Kaiserlingscher Flüssigkeit.

*Welche Halslymphdrüsen pflegen bei der Infektion des Augenbindehautsackes tuberkulös zu erkranken?* Im allgemeinen sind es beim Meerschweinchen dieselben Drüsen wie bei der oralen Infektion. Die Submental- und Submaxillardrüsen zeigen eine ihrer Größe entsprechende Hyperplasie. Sie haben meist eine gelbgraue oder gelbweiße Farbe und lassen schon makroskopisch zuweilen eine teilweise oder gänzliche Verkäsung erkennen. Eine Erweichung und Verflüssigung der verkästen Partien haben wir nur sehr selten bemerkt. Trotz einer oft sehr starken Vergrößerung ist die Gestalt der Drüsen erhalten; das ist besonders bei den tiefen Halslymphdrüsen der Fall. Auch das Bild dieser Drüsen (mit ihrer ovalen länglichen Gestalt), die manchmal eine sehr starke, bis zu Haselnußgröße gehende Hyperplasie zeigen, ist sehr charakteristisch (s. Abb. 1 u. 2).

*Tabelle III. Versuche mit conjunctivaler Infektion bei*

Infektion durch Aufträufeln eines Tropfens einer Tuberkelbacillenkultur-
geöffnet gehalten wird. Nach der angegebenen Zeit werden

| Nr. | Datum des Versuchs | Infektion mit: Stamm | Infektion mit: Dosis | Getötet nach? | Gewicht zu Beginn g | Gewicht zu Ende g | Auge | Kieferwinkeldrüsen: Gland. subment. und submaxill. | Halsdrüsen: Gland. cervical. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 (8) | 18. V. 1921 | Tb. human. Neugebauer. Glycerinbouillonkultur vom 13. V. | 1 Tropfen einer Verreibung von 10 m Kultur in 2 ccm Kochsalzlösung = 8³/₄ Mill. Keime. | 24 | 280 | ? | Auge auf ¹/₂ geschrumpft. Hornhaut trübe. Lidränder borkig belegt. R. Auge o. B. | 1 große Drüse. | Links: 1 bohnengroße Drüse m dial von der V. jugularis a Zusammenfluß der Vena faci lis anter. und Vena jugula interna. Seitlich davon 1 Dr se von ¹/₂ Größe. Rechts entsprechender Lage 2 kleine Drüsen. |
| 2 (10) | | | | 31 | 250 | ? | Wie 1. | 4 linsengroße, weißgelbliche Drüsen. | Links 1 haselnußgroße, latera kirschkerngroße Drüse, rech 1 Paket von 2 bohnengroß Drüsen. |
| 3 (11) | | | | 40 | 240 | 315 | Wie 1. | 4 erbsengroße Drüsen. | Halsmitte ausgefüllt von 1 kirsch großem Paket, das aus de beiderseitigen medialen Drüsen gebildet ist. Seitlich davon links 1 kirschkern große, rech 1 bohnengroße Drüse. |
| 4 (9) | | | | † 68 | 290 | ? | Wie 1. | 4 erbsengroße Drüsen. | Beiderseits walnußgroß. |
| 5 (7) | | | | † 72 | 410 | 340 | Wie 1. | — | Beiderseits kirschkern- bis wa nußgroß. |
| 6 (437) | | | 8 750 000 Keime | 187 | 460 | 470 | O. B. | | An der r. Halsseite ein bohnen eiternder Defekt, welcher d Ausgang eines Fistelganges darstellt und zu einer verkäst bohnengroßen Halsdrüse führt. Auf der r. Halsseite noch weitere ebens. Drüsen. Die l. Halsseite ist ausgefüllt v einem übertaubeneigroßen Paket verkäster Drüsen. I neben liegt kieferwärts noch je 1 kirschgroßes Paket. |
| 7 (444) | | | | 84 | 150 | 350 | Rechts klein. als links. Lidränder mit borkig. Beläg. bedeckt | 3 erbsengroße grauweiße Drüsen. | Links: 1 überbohnengroße Drü rechts ein Paket aus einer etw größeren und einer kirschker großen Drüse. |
| 8 (443) | | | 875 000 Keime | 85 | 120 | 330 | Wie 7. | Wie 7. | Wie 7. |
| 9 (438) | | | | † 154 | 440 | ? | — | — | — |



*Meerschweinchen* (mit abgestuften Infektionsdosen).

**Verreibung auf das rechte unbehandelte Auge, welches 10 Minuten lang leicht die Tiere durch Chloroform getötet. † = spontan gestorben.**

| Lungen- und Bronchialdrüsenbefund | Milz und andere Organe | Diagnose |
|---|---|---|
| Normal. | Reichlich kleinste submiliare Knötchen. | Hyperplasie der Halslymphdrüsen, beginnende Tuberkulose der Milz. Kein Lungenbefund. |
| Bronchialdrüse: Linsengroß. Lunge: Ziemlich reichlich weißliche Knötchen. | Milz: Ziemlich groß mit ziemlich reichlich weißlich durchschimmernden Knötchen. | Hyperplasie der Hals- und Bronchialdrüsen. Tuberkulose der Milz und Lungen. |
| Lungen: Dunkelrote scharfrandige Verdichtungen von verschiedener Gestalt und Größe, die zum Teil konfluieren. Dazwischen vereinzelt ziemlich große hellgraue, leicht erhabene Knötchen, von denen ein Teil ein gelbes Zentrum hat. | Milz: Groß mit ziemlich reichlich derben Knötchen. 1 Bohnengroße Mesenterialdrüse. | Hyperplasie der Hals- und einer Mesenterialdrüse. Tuberkulose der Milz und der Lungen, in den Lungen beginnende Verkäsung. |
| Lungen: Ziemlich reichlich Knötchen. Besonders reichlich im r. Unterlappen. | Milz: Sehr groß (5 cm) mit sehr zahlreichen Knötchen. Leber hat stecknadelkopfgroße Knötchen. | Hyperplasie der Halslymphdrüse. Tuberkulose der Lungen und der Milz. Beginnende Tuberkulose der Leber. |
| Lungen: Mit reichlich gelblichen, zum Teil konfluierenden Knötchen. | Milz: Groß mit zahlreichen Knötchen. | Hyperplasie der Halslymphdrüsen unter Ausschluß der Kieferwinkeldrüsen. Tuberkulose der Milz und der Lungen, bei dieser mit Verkäsung. |
| Sehr zahlreiche grauschimmernde Tuberkelknötchen, welche besonders reichlich in den Randpartien und nach der Spitze zu sind. | Milz: Sehr groß. 10 : 3,5 cm mit Tuberkelknötchen stark durchsetzt. Leber: Ebenfalls reichlich Knötchen enthaltend. | Gewaltige Hyperplasie und Verkäsung der Halsdrüse. Tuberkulose der Milz, Leber und der Lungen, besonders an den Spitzen und Rändern. |
| Lunge: Vereinzelt schmutzig graurote hepatisierte, unregelmäßig gestaltete Herde von etwa Erbsengröße. In einigen dieser Herde stecknadelkopfgroße, etwas hellere, leicht erhabene Knötchen. | Milz: 4,5 cm lang mit spärlich graugelben, stecknadelkopfgroßen Knötchen. | Hyperplasie der Halsdrüsen. Beginnende Tuberkulose der Milz und der Lunge. |
| Lungenherde etwas ausgedehnter, Zahl der Knötchen etwas größer. | Wie 7. | Wie 7. |
| Zerstreute hepatisierte Herde in der Größe eines halben Lappens. | Milz: Groß, dunkelrot. Leber: Braunrot gelblich. Niere: Mit gelblichen (Eiter-) Herden durchsetzt. Herzmuskel: gelblichweiße (Eiter?) Herde. | Für Tuberkulose kein charakteristischer Befund. Tier offenbar an einer Stallseuche eingegangen. |



*Tabelle III*

| Nr. | Datum des Versuchs | Infektion mit: Stamm | Infektion mit: Dosis | Getötet nach? | Gewicht zu Beginn g | Gewicht zu Ende g | Auge | Kieferwinkeldrüsen: Gland. subment. und submaxill. | Halsdrüsen: Gland. cervical. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 10 (439) | 13. VI. 21. | Tb. human. Neugebauer. Glycerinbouillonkultur vom 23. V. | 87 500 Keime | 235 | 150 | 500 | — | 1 graurötliche, erbsengroße Drüse. | Rechts: Ein kleinkirschengroßes Paket aus 2 etwa bohnengroßen weißgelblichen Drüsen. Links: entsprechend 1 etwa bohnengroße weißrötliche Drüse. |
| 11 (440) | | | | 95 | 150 | 380 | — | — | — |
| 12 (441) | | | 8750 Keime | 121 | 180 | 570 | — | — | — |
| 13 (442) | | | | 88 | 160 | 460 | — | — | — |
| 14 (487) | 5. X. 21. | Tb. human. Ludwig. Glycerinbouillonkultur vom 22. IX. 1921 | 2500 Keime | 49 | 430 | 470 | — | — | Rechts ein kirschgroßes Paket aus 2 etwa gleichgroßen Drüsen gebildet. |
| 15 (489) | | | | 76 | 320 | 270 | — | — | Rechts von der Mitte des Halses eine kirschgroße weißgelbliche nicht verkäste Drüse. |
| 16 (495) | | | 13 Keime | 148 | 330 | 530 | — | — | — |
| 17 (488) | | | | 148 | 300 | 370 | — | — | — |

*(Fortsetzung).*

| Lungen- und Bronchialdrüsenbefund | Milz und andere Organe | Diagnose |
|---|---|---|
| Lungen: Durch unregelmäßige braunrote Indurationen fleckig. Linke Lunge am unteren Rande mit der Pleura costalis verwachsen. Die Spitzen sind hepatisiert, mit graugelblichen Knötchen durchsetzt. Hepatisationen mit gleichen Knötchen an der vorderen Seite des linken Unterlappens. Außerdem vereinzelt, grauweiße scharf konturierte Knötchen im Gewebe, so im linken Oberlappen, im l. Unterlappen und 2 im r. Unterlappen. | Milz: o. B. Gravidität mit ca. 100 g schwerem Foetus. | Hyperplasie der Halsdrüse. Tuberkulose der Lungen, besonders der Spitzen bei Freibleiben der Milz. |
| Lungen dunkelrot gefleckt. In beiden Ober- und Unterlappen je 1 nur wenige Millimeter großer dunkelroter unregelmäßig geränderter Herd; außerdem verstreute etwa 10 stecknadelkopfgroße Knötchen. | Milz: 4 : 1, braunrot mit zahlreichen hellroten, stecknadelkopfgroßen Knötchen. | Keine Hyperplasie der Halsdrüse. Tuberkelknötchen in Milz und Lunge (Bild einer Inhalationstuberkulose). |
| Lungen enthalten einzelne dunkelrot-schwarzrote fleckenartige Verfärbungen, von Erbsengröße, die zum Teil einzeln liegen, am Rande konfluieren. R. Oberlappen hepatisiert, darin zahlreiche feinste Knötchen. | Gravidität. | Keine Veränderungen der Halsdrüsen. Feinste Tuberkelknötchen in den Lungen, auch mikroskopisch. Tuberkelbacillen in den veränderten Geweben der Lungen durch Tierversuch nicht nachweisbar. |
| Lungen hellrot bis auf einen Teil des rechten Unterlappens, der dunkler und von derber Konsistenz ist. Außerdem im l. Oberlappen und r. Unterlappen je ein kleinerbsengroßer dunkelgrauroter Herd. | Milz: 4 cm lang, braunrot, mit zahlreichen leicht erhabenen Knötchen. | Keine Veränderungen der Halsdrüsen. Tuberkulose der Milz und Lungen. |
| Lungen unregelmäßig durchsetzt von dunkelroten hepatisierten konfluierenden Herden mit einzelnen Knötchen. | Milz: Groß mit vereinzelten hellen hirsekorngroßen Knötchen. | Tuberkulose der Halsdrüsen, der Milz und der Lungen. |
| Rechter Oberlappen zum größten Teil, linker Oberlappen fast ganz hepatisiert, mit ziemlich reichlich grauweißen Knötchen. Ebensolche Knötchen auch auf der Oberfläche der sonst lufthaltigen Lunge | Milz sehr groß mit zahlreichen Tuberkelknötchen. Leber ebenso. | Tuberkulose der Halsdrüsen, der Lungen, Milz und Leber. |
| An der Vorderfläche des linken Unterlappens 2 stecknadelgroße, graue, leicht erhabene Knötchen. Eine Gruppe von 3 ebensolchen Knötchen auf der medialen Fläche des rechten Unterlappens. Oberlappen völlig frei. | — | Sehr geringe Knötchenbildung in den Lungen. |
| Nur an der Zwerchfellfläche des rechten Unterlappens 3 Knötchen von demselben Aussehen wie bei Tier 16 | — | Wie 16. |



*Tabelle IV. Versuche mit conjunctivaler*

**Injektion wie bei den Meerschweinchen der Tabelle III, doch auf die Conjunctiva schlag (oder Chloroform) getötet.**

| Nr. | Datum des Versuchs | Infektion mit | | Getöt. n. ? Tag. | Gewicht zu | | Auge | Kieferwinkeldrüsen: Gland. subment. und submaxill. | Halsdrüsen: Gland. cervical. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Stamm | Dosis | | g Beginn | g Ende | | | |
| 1 (405) | 26. VIII. 1921 | Perlsucht? | 3 Tropfen einer 10fach verdünnten Verreibung von 10 mg Glycerinbouillonkultur in 5 ccm Kochsalzlösung = ca. $10^1/_2$ Millionen Keime | † 17 | 1770 | ? | Conjunctivitis links. | — | — |
| 2 (403) | | | | 35 | 1520 | ? | Conjunctiva gerötet, Follikel deutlich erkennbar. Absonderung von Eiter, der an einzelnen Stellen Beläge bildet. Das ganze Auge ist geschrumpft. | Vergrößert. | Überbohnengroß, graurötlich, an einzelnen Stellen gelbweiß (verkäst?). Die der rechten Seite haben keine solche verkäste Stellen. |
| 3 (402) | | | | 60 | 1700 | ? | Rötung und Eiterabsonderung. | — | Links 1 haselnußgroße Cervicaldrüse und 1 etwas kleinere Retropharyngealdrüse mit durchschimmernden gelbweißen Knötchen an einzelnen Stellen. Die entsprechenden Drüsen rechts sind etwas kleiner. |
| 4 (401) | | | | † 83 | 1770 | ? | — | — | Beiderseits je 1 bohnengroße, zum Teil verkäste Drüse. |
| 5 (404) | | | | † 101 | 1650 | 1140 | Umgebung des linken Auges mit gelbweißem Eiter und Borken belegt Bulbus nicht mehr nachweisbar. | Vor der Vena jugularis externa 1 bohnengroße gelbliche Drüse. | Zwischen V. externa und interna 2 erbsengroße gelbliche Drüsen |
| 6 (381) | 29. VI. 1921 | Tb. bovin. Schlachth. Glycerinbouillonkultur vom 7. VI. | 1 Tr. einer Verreib v. 10 mg in 2 ccm Kochsalzlös. = ca. $8^3/_4$ Mill. Keime | — | 760 | ? | — | — | — |
| 7 (382) | | | | 122 | 740 | 2050 | — | — | — |
| 8 (383) | | | | 223 | 710 | 2050 | — | — | — |
| 9 (379) | | | | † 42 | 1970 | ? | — | — | — |
| 10 (380) | | | | — | 2750 | ? | — | — | — |
| 11 (385) | | | | † 42 | 2300 | ? | — | — | — |

*Infektion bei Kaninchen.*

des linken Auges. Die Tiere werden nach den angegebenen Zeiten durch Nacken-
† = spontan gestorben.

| Lungen- und Bronchialdrüsenbefund | Milz und andere Organe | Diagnose |
| --- | --- | --- |
| — | Magenruptur. Darmverschlingung. | Interkurrenter Tod; ohne tuberkulöse Veränderungen außer der Conjunctivitis. |
| ...ungen gebläht, braunrot, blutreich, durch hellere Partien wie marmoriert aussehend; Knötchen nicht erkennbar. | — | Tuberkulöse Augenbindehautentzündung. Hyperplasie der Halsdrüsen mit beginnender Verkäsung der linksseitigen. |
| ... beiden Lungenhälften stecknadelkopfgroße und größere, zum Teil glasige, zum Teil in der Mitte verkäste Knötchen in großer Zahl. Größere Herde von Erbsengröße und darüber liegen besonders an den Rändern; der rechte Oberlappen ist zur Hälfte käsig hepatisiert. | — | Hyperplasie der Halsdrüsen. Ausgesprochene Tuberkulose der Lungen bei Intaktheit der übrigen Organe. |
| ...ke Lunge mit der Pleura völlig verwachsen. Lungen dunkelrot, zum Teil schwarzrot mit weißgelblichen bohnengroßen, zum Teil konfluierenden tuberkulösen Herden. Außerdem erbsengroße, weißliche Herde, besonders an den Rändern. Rechte Lunge ebenfalls, doch nicht so stark, verändert. | — | Hyperplasie der Halsdrüsen. Mit Seuche komplizierte, zum Teil in Verkäsung begriffene Tuberkulose der Lungen bei Intaktheit der übrigen Organe. |
| ...ungen reichlich durchsetzt mit gelblichen, bohnengroßen, konfluierenden, tuberkulösen Herden. Dazwischen kleine, graue Knötchen in sehr großer Zahl. | Nieren weisen vereinzelte weißliche Knötchen unter der Kapsel auf. Die anderen Organe o. B. | Hyperplasie und Verkäsung der Halsdrüsen. Mit Seuche komplizierte Tuberkulose der Lungen bei Intaktheit der anderen Organe, mit Ausnahme der Nieren. |
| — | — | Am 6. II. 1922 als normal aus dem Versuch genommen. |
| — | — | Keine nachweisbaren tuberkulösen Veränderungen. |
| — | — | Wie 7. |
| ...euche. | — | Wie 7. Tod an Seuche. |
| — | — | Wie 6. |
| ...euche. | — | Wie 7. Tod an Seuche. |



*Tabelle IV*

| Nr. | Datum des Versuchs | Injektion mit: Stamm | Injektion mit: Dosis | Getöt. n. ? Tag. | Gewicht zu Beginn g | Gewicht zu Ende g | Auge | Zwischenkieferwinkeldrüsen | Halsdrüsen |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 12 | 13. X. 1921 | Tb. bovin. I. | 2 Tropfen einer Verreibung von 10 mg Kultur | 106 † | 1350 | ? | Hornhaut getrübt. Lidränder beiderseits verklebt. Nasenlöcher u. Umgebung mit schmierig-eitrigem Sekret bedeckt. | Nicht vergrößert. | Rechts: Bohnengroß, hart, v- Links: o. B. |
| 13 | | | 1 Tropfen | † 105 | 1570 | ? | — | Erbsengroß, weiß, hart. | Rechts: 2 bohnengroße, [illegible] verkäste Drüsen. Links: o. B. |
| 14 | | | | † 31 | 1350 | ? | — | — | — |

*Tabelle V. Versuch*

Tb. human. Neugebauer, Glycerinbouillonkultur vom 10. VI. Dosis: 1 Tropfen
Der Tropfen wird auf das unbehandelte rechte Auge

| Nr. | Getötet nach | Gewicht zu Beginn g | Gewicht zu Ende g | Auge | Zwischenkieferwinkeldrüsen | Halsdrüsen |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 (347) | 6 Std. | 170 | 170 | — | — | — |
| 2 (395) | 24 „ | 170 | 170 | — | — | — |
| 3 (398) | 92 Tagen | 210 | 310 | Rechts: klein, Hornhaut klar, Lidränder borkig belegt, links: klein, Hornhaut trübe. An derselben ein weiß durchschimmerndes Bläschen. Lidränder borkig belegt. | — | Als dicke Pakete deutl beim lebenden Tier ta bar. Bei der Sektio rechts 2 über bohnengroß links 1 ebensolche u 1 erbsengroße lateral legene Drüse. |

Mit je einer Lungenhälfte der durch Nackenschlag getöteten Meerschweinchen Nr. 1 und 2 wird e tuberkulöse Veränderungen.

Bei Kaninchen, deren Augenbindehaut natürlich mit einem Perlsuchtstamm infiziert wurde, erzielten wir dasselbe Krankheitsbild; doch gibt es hier einige Unterschiede. Die Hyperplasie der Drüsen erreichte beim Kaninchen niemals einen so hohen Grad wie beim Meerschweinchen, bei dem hin und wieder Drüsenpakete bis zu Kirschgröße entstanden waren. Sie gingen durchweg über Bohnengröße nicht hinaus, dafür war jedoch die Verkäsung oft eine totale.



*(Fortsetzung).*

| Lungen- und Bronchialdrüsenbefund | Milz und andere Organe | Diagnose |
|---|---|---|
| Perikard und untere Pleurafläche sind fast in ihrer ganzen Ausdehnung mit der vorderen Brustwand verwachsen. In beiden Pleurahöhlen trübe, gelbliche Flüssigkeit, links mehr als rechts. Die Lungen sind nicht kollabiert, an der Oberfläche ungleichmäßig gelb-rötlich gefärbt. Ungleichmäßig verteilte, hirsekorngroße, weißliche, leicht erhabene Knötchen reichlich vorhanden. | Milz: o. B. Nieren, mäßig zahlreiche, weißliche, zum Teil gelbliche unter der Kapsel gelegene, durchschimmernde Knötchen, die sich nur auf die Rindenschicht beschränken. Leber: o. B. | Leichte Hyperplasie der Halsdrüsen. In der Hauptsache auf die Lungen beschränkte, mit Stallseuche komplizierte Tuberkulose, von welcher in mäßigem Grade auch die Rindenschicht der Nieren ergriffen ist. |
| Wie 12. | Wie 12. | Hyperplasie der Halsdrüsen stärker als 12, dazu teilweise Verkäsung, doch auffallenderweise nur auf der rechten Seite. |
| — | — | Tod an Ileus. |

*vom 6. VII. 1921.*

einer Verreibung von 10 mg in 2 ccm Kochsalzlösung (ca. $8^3/_4$ Mill. Keime). aufgeträufelt und das Auge 10 Minuten lang offengehalten.

| Lungen- und Bronchialdrüsenbefund | Milz und andere Organe | Diagnose |
|---|---|---|
| — | — | In den Lungen sind durch Tierversuch Tuberkelbacillen nicht nachweisbar. |
| | | Wie 1. |
| ...nge: nur vereinzelte Knötchen von Kleinerbsengröße, die leicht erhaben und von glasheller oder grauer Farbe ...end. | Milz: groß mit deutlichen Knötchen. | Conjunctivitis. Hyperplasie der Halsdrüsen. Tuberkelknötchenbildung in den Lungen. |

...rschweinchen subcut. geimpft. Keins dieser Tiere zeigt bei seiner Tötung am 6. X. (also nach 3 Monaten).

Daß auf conjunctivalem Wege eine Halslymphdrüsentuberkulose zu erzeugen ist, ist ja keine neue Tatsache. *Calmette* mit seinen Mitarbeitern *C. Guérin* und *V. Grysez*[1]) hat bekanntlich diesen Infektionsweg eingehend studiert.

Es genügt, sagt *Calmette*, auf den Bulbus eines Meerschweinchens

[1]) Comptes rendus de la Société de biologie 1913, S. 310, und *R. Calmette*, l'Infection bacillaire et la Tuberculose. Masson et Cie, Paris 1920, S. 122.





entweder etwas tuberkulöses Sputum oder einen Tropfen einer Bacillenemulsion (par exemple 0 mgr 0,1 de bacilles virulents) fallen zu lassen, um bei diesem Tier eine typische Halsdrüsentuberkulose sich entwickeln zu sehen. Diese Art der Infektion ist sehr sicher und die Form der Tuberkulose, die man erhält, ist der Skrofulose durchaus ähnlich. Insoweit decken sich die Angaben der genannten Autoren mit unseren Erfahrungen. Dagegen können wir *Calmette* nicht beipflichten, wenn er sagt, daß eine solche Infektion nicht die geringsten Veränderungen am Augapfel, seiner Lider oder deren unmittelbarer Nachbarschaft im Gefolge hat, ebenso in dem wichtigen Punkte, welche Drüsen nach der conjunctivalen Infektion tuberkulös werden. Die typische Halsdrüsentuberkulose beginnt nach *Calmette* „par le ganglion rétro-mastoïdien envahissant aussitôt les deux ganglions rétropharyngiens, les deux ganglions de la partie antérieure du cou, puis les trachéaux, les bronchiques, et s'étendant en l'espace de quatre à cinq semaines à d'autres groupes viscéraux, aux ganglions du hile du foie, à ceux du mésentère, parfois aussi à des ganglions superficiels tels que les inguinaux, à la rate et presque constamment aux poumons".

Das Bild, das *Calmette* als eine Folge conjunctivaler Infektion geschildert hat, ist das einer allgemeinen Drüsentuberkulose des ganzen Meerschweinchenorganismus; vielleicht sind die Befunde verschieden je nach der Größe der Infektionsdosis und nach dem Zeitpunkt des Todes.

Daß die Augenbindehaut und der Bulbus oculi nicht erkranken soll, trifft nach unseren Erfahrungen ebenfalls nicht zu. Es ist allerdings zuzugeben, daß die Erscheinungen der chronischen Conjunctivitis bei Meerschweinchen sehr gering sein oder ganz fehlen können, zumal wenn sehr geringe Infektionsdosen zur Anwendung kamen. Bei einigen Tieren beobachteten wir aber eine Phthisis bulbi, die manchmal sogar doppelseitig war. Auf die Entstehung solcher Ophthalmien gehen wir nicht näher ein; hier bietet sich für einen Ophthalmologen ein dankbares Feld, dieses interessante Krankheitsbild genauer zu studieren.

Viel hochgradiger sind dagegen die Veränderungen bei Kaninchen. Bei ihnen entwickelte sich fast regelmäßig eine chronische Conjunctivitis, die manchmal so hochgradig wurde, daß auch der Bulbus in Mitleidenschaft gezogen wurde, und eine Phthisis bulbi mit vollständiger Zerstörung des Augapfels eintrat. Das erste Zeichen der Erkrankung der Bindehaut war gewöhnlich ein chronischer Katarrh mit einer entzündlichen Hypertrophie der Schleimhaut, auf der manchmal eitrige fibrinöse Beläge zu konstatieren waren. Die Erkrankung beschränkte sich beim Kaninchen auf das infizierte Auge.

*Es ist jedenfalls sehr bemerkenswert, daß eine durch die Augenbindehaut vermittelte Infektion dasselbe Bild der Halsdrüsentuberkulose bei*



*Meerschweinchen und Kaninchen hervorrufen kann wie die orale Infektion.* Die von der Schleimhaut des Conjunctivalsackes aufgenommenen Tuberkelbacillen werden denselben Halsdrüsen zugeführt, wie von der Mundschleimhaut resorbierte. In den Lymphdrüsen bleiben sie gewöhnlich liegen, um hier ihre zerstörende Tätigkeit zu beginnen. Sie können die Drüsen unter gewissen Umständen aber auch passieren, ohne makroskopisch sichtbare Veränderungen in ihnen zu hinterlassen. Ist auch das Wurzelgebiet der Lymphbahnen des Augenbindehautsackes und das der Mundschleimhaut ein verschiedenes, erfolgt die Aufnahme der Bacillen auch getrennt voneinander, die Abflußwege zu den tieferen Halslymphdrüsen sind dieselben. Der Weg ist folgender: die Lymphbahnen der Conjunctiva führen ihren Inhalt den Submental- und Submaxillardrüsen und von hier aus weiter den tiefen Halslymphdrüsen zu. Hier schneidet ebenso wie bei der durch die orale Infektion erzeugten Halsdrüsentuberkulose die Erkrankung scharf ab. Beziehungen oder Verbindungen zu den supraclavicularen oder zu den tracheo-bronchialen Lymphdrüsen bestehen nicht. Durch den Truncus cervicalis gelangt die Lymphe dann in die Vene. Nach *Most* entsendet das äußere Auge (Lider und Conjunctiva) seine Lymphe einerseits zu den Submaxillar-, andererseits zu den parotidealen und oberflächlichen cervicalen Lymphdrüsen. „Die tiefen Cervicalen sind auch hier die zweite Etappe." (*Most.*)

In unseren Versuchen waren auch die Submentaldrüsen meist erkrankt. Ihnen muß also auch Lymphe zufließen; dagegen haben wir beim Meerschweinchen die Lymphdrüsen der Parotis makroskopisch nicht verändert gefunden. Aber hiervon abgesehen, entspricht das pathologisch-anatomische Bild der auf conjunctivalem Wege erhaltenen Halsdrüsentuberkulose durchaus den Ergebnissen, welche die Anatomen durch Injektionsversuche über die Lymphgefäßverhältnisse beim normalen Meerschweinchen gewonnen haben. Unsere mit der oralen und conjunctivalen Infektion gemachten Erfahrungen sind also eine Bestätigung der allgemein wichtigen Feststellung der Anatomen, *daß die gesamte Lymphe des Kopfes durch die Lymphbahnen des Halses in der Vene abfließt.*

Diese Tatsache ist nicht nur für die tuberkulöse, sondern auch für die Infektion mit anderen Erregern von erheblicher Bedeutung. Unsere Versuche mit Tuberkelbacillen beweisen zunächst mit Sicherheit, daß wenigstens ein Teil der infizierenden Dosis von der Schleimhaut des Conjunctivalsackes aufgenommen wird, und daß die Bacillen dort eine Erkrankung hervorrufen können. Unsere ersten Versuche wurden unter dem Gesichtspunkte angestellt, die Durchlässigkeit der Augenbindehaut für den Tuberkelbacillus zu prüfen und die sich daraus ergebenden Folgezustände für die übrigen Organe festzustellen. Wie Mitteilungen aus





der Literatur beweisen, ist die Durchlässigkeit der Conjunctivalschleimhaut für andere Erreger bereits im bejahenden Sinne entschieden worden. So haben die deutsche Pestkommission (Berl. 1899) und *Kolle* (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr. 36. 1901) nach Einträufeln von Pestmaterial auf die Conjunctiva von Ratten die Tiere in jedem Falle an Pest erkranken sehen. Auch von Trypanosomen ist bekannt, daß man durch conjunctivale Infektion eine Allgemeinerkrankung erzeugen kann. Die Pneumokokken dringen nach *Römer* von der Bindehaut aus durch die Schleimhaut und verursachen eine Allgemeinerkrankung. Es wäre jedenfalls von größtem Interesse, derartigen Zusammenhängen weiter nachzugehen.

Neuerdings ist von amerikanischen Autoren die Annahme vertreten worden, daß in nächster Umgebung eines Pneumonikers befindliche Personen sich durch Aufnahme kokkenhaltiger Tröpfchen nicht ganz selten eine genuine Pneumonie zuziehen. (Zit. nach *Neufeld*, D. m. W. 1922, Nr. 2.) Nach unseren Versuchen über die Entstehung der Inhalationstuberkulose halten wir es aber für durchaus wahrscheinlich, daß auch die akute Pneumonie auf dem lymphohämatogenen Wege zustande kommen kann, und zwar durch Resorption der Pneumokokken von den katarrhalisch erkrankten Schleimhäuten des Rachens aus, auf denen sich schon bei normalen Personen, ganz besonders aber bei Erkältungskrankheiten, Pneumokokken vorfinden. Vielleicht ist die Schleimhaut der Conjunctiven als Eintrittspforte für Erreger anderer Infektionskrankheiten bisher unterschätzt worden. Conjunctivale Infektion soll auch bei der Pest während der großen Lungenpestepidemie in *Charbin* beobachtet worden sein.

Wenn es möglich ist, mit Tuberkelbacillen auf experimentellem Wege eine Erkrankung der Augenbindehaut, weiter eine Halsdrüsen- und eine Lungentuberkulose hervorzurufen, so darf man wohl annehmen, daß der Tuberkelbacillus auch unter natürlichen Verhältnissen auf diese Weise seinen Eingang in den menschlichen Organismus finden kann. Es ist von vornherein wahrscheinlich, daß bacillenhaltige Tröpfchen, durch den Hustenstoß eines Phthisikers herausgeschleudert, auch auf die Schleimhaut des Augenbindehautsackes geraten können, um dort von den Lymphgefäßen aufgenommen zu werden. Mehr aber noch als durch eine direkte Ablagerung von bacillenhaltigen Tröpfchen ist die Möglichkeit und Wahrscheinlichkeit vorhanden, daß Keime durch eine Schmierinfektion dahin gelangen, wenn z. B. mit Tuberkelbacillen verunreinigte Hände und Finger durch Kontakt mit der Augenbindehaut die Erreger dorthin übertragen. Besonders bei Kindern in der Umgebung von Phthisikern wird es der Fall sein, daß sie sich auf solche Weise ihre Schleimhäute infizieren. *Vielleicht verdanken die im Kindesalter verhältnismäßig häu-*





*figen skrofulösen Conjunctividen ihre Entstehung einer solchen Schmutz- und Schmierinfektion.* Wir glauben, daß man mit der Conjunctivalschleimhaut als Eintrittspforte für den Tuberkelbacillus mehr als es bisher geschehen ist, praktisch wird zu rechnen haben, ebenso mit der Tatsache, daß die Halsdrüsentuberkulose nicht nur durch eine orale, sondern auch durch eine conjunctivale Schmutz- und Schmierinfektion entstehen kann.

Es ist von einigen Autoren behauptet worden, daß es nicht die Schleimhaut selbst ist, welche die pathogenen Keime aufnimmt, sondern daß diese auf dem Umwege über den Tränennasenkanal in die Mund- und Rachenhöhle und von dort in den Organismus gelangen. Die Möglichkeit, daß ein Teil des infizierenden Materials diesen Weg nehmen kann, wollen wir durchaus nicht in Abrede stellen; aber da es sich z. B. bei der gonorrhoischen Conjunctivitis um eine echte Schleimhauterkrankung handelt und bei der Pneumokokkenconjunctivitis dasselbe der Fall ist, so ist daran nicht zu zweifeln, daß daneben auch die Schleimhaut selbst die Keime aufnimmt bzw. ihre Lymphgefäße und mit ihrer Umgebung primär erkranken können. Das trifft auch für den Tuberkelbacillus zu, wie unsere Versuche mit Sicherheit ergeben haben.

Aus der Tabelle III geht hervor, daß bei sämtlichen fünf Meerschweinchen des 1. Versuchs (1—5) eine Erkrankung des Auges vorhanden war. Die Cornea des infizierten Auges war trübe, von weißgrauer Farbe, der Bulbus meist um die Hälfte geschrumpft, die Lidränder borkig belegt. Das nicht infizierte Auge zeigte makroskopisch keine Veränderungen.

### *Die Beziehungen der Halsdrüsentuberkulose zu den übrigen Organerkrankungen.*

Wenn man ein oral oder conjunctival infiziertes Meerschweinchen oder Kaninchen, bei dem sich eine Halsdrüsentuberkulose entwickelt hat, nach Verlauf von einigen Wochen seziert, so wird man finden, daß die Erkrankung der Halsdrüsen nicht die einzige tuberkulöse Affektion ist, sondern daß daneben auch andere innere Organe, vor allem die Lungen und die Milz, fast regelmäßig tuberkulös erkrankt sind. Die wichtigste Frage, die sich hier aufdrängt, ist die, auf welchem Wege die bei gleichzeitigem Bestehen einer Halsdrüsentuberkulose vorhandene Lungenerkrankung zustande kommt. Die Frage hat nicht nur theoretisches Interesse, sondern auch praktische Bedeutung.

Ein direktes Übergreifen des tuberkulösen Prozesses von den Halslymphdrüsen auf das tracheo-bronchiale Lymphgefäßsystem der Lunge erscheint nach den anatomischen Verhältnissen ausgeschlossen. Denn Verbindungen zwischen diesen beiden Lymphgefäßsystemen bestehen



nicht. Es muß also noch einen anderen Weg geben, auf dem die von der Mundhöhle oder der Augenbindehaut aufgenommenen Tuberkelbacillen in die Lunge, Milz usw. gelangen.

Für die Beantwortung dieser Frage ist ein pathologisch-anatomischer Befund von entscheidender Bedeutung, nämlich die tuberkulöse Erkrankung der Milz, die bei fast allen Tieren festzustellen war. Diese kann unmöglich auf dem Wege der direkten Fortleitung der Bacillen durch die Lymphbahnen zustande gekommen sein. Hier besteht nur die eine Möglichkeit, daß die Milz auf dem Blutwege infiziert ist. Man darf wohl ohne Widerspruch behaupten, daß die primäre Erkrankung der Augenbindehaut und der Halslymphdrüsen den Ausgangsort für die tuberkulöse Erkrankung der Milz darstellt. Wir müssen annehmen, daß von diesen primären Herden dann und wann Tuberkelbacillen in die allgemeine Zirkulation geraten, mit dem Blutstrom in die Milz getragen und in den Endothelien der Milzgefäße haftenbleiben. Wenn man dies aber ohne Widerspruch von der Milz behaupten darf, so ist auch die weitere Schlußfolgerung gerechtfertigt, daß auch die Lungenerkrankung eine sekundäre Affektion und ebenfalls auf hämatogenem Wege entstanden zu denken ist. Dafür spricht ja auch im allgemeinen der pathologisch-anatomische Befund der erkrankten Lunge, bei der tuberkulöse Herde über das ganze Lungenparenchym ausgestreut sind. Das wird zwar häufig auch bei der Inhalationstuberkulose beobachtet, dieser Infektionsmodus scheidet aber hier aus.

Natürlich verläuft die Erkrankung nicht immer nach demselben Schema; vielleicht war der Prozeß der Drüsenerkrankung z. B. bei dem Tier 1, Tabelle III, noch nicht so weit fortgeschritten, daß es zu einem Einbruch von Bacillen in die Blutbahn kam. Es können auch Lymphdrüsen von der Erkrankung verschont bleiben, gewissermaßen übersprungen werden, wie Fall 5 der Tabelle III lehrt. Hier waren die Halsdrüsen walnußgroß, während die Submaxillardrüsen sich makroskopisch normal erwiesen, ja es kann sogar vorkommen, wie die späteren Ausführungen zeigen, daß der Drüsenbefund ein sehr geringfügiger, die Lungenerkrankung dagegen um so erheblicher ist. Alles Tatsachen, denen wir ja auch bei anderen Erkrankungen öfter begegnen. *So viel geht jedenfalls aus den Versuchen hervor, daß man von einem starken Befallensein eines Organes nicht ohne weiteres auf das Alter und den Ursprungsort der Infektion Schlüsse ziehen darf.*

Die pathologisch-anatomischen Befunde, die unsere oral und conjunctival infizierten Kaninchen darboten, sind hervorragende Beispiele für die Richtigkeit dieses Satzes. Die Drüsentuberkulose tritt bei diesen Tieren gegen die Erkrankung der Lunge stark in den Hintergrund. Von allen inneren Organen ist sie am stärksten verändert. Die ganze Lunge ist bis auf das 3—4fache vergrößert, von gelbweißen



Knoten durchsetzt, so daß kaum mehr atmungsfähiges Parenchym vorhanden zu sein scheint. Von anderen Organen finden sich bei der oralen und conjunctivalen Perlsuchtinfektion des Kaninchens gewöhnlich nur noch die Nieren verändert, die manchmal spärliche, manchmal zahlreiche Tuberkelknötchen von Stecknadelkopfgröße und darüber erkennen lassen. Die übrigen Organe erscheinen makroskopisch meist nicht verändert, um so stärker kontrastiert damit die ausgebreitete Lungentuberkulose; sie zieht sofort die Aufmerksamkeit des Beobachters auf sich, und da die Lunge am stärksten verändert und die scheinbar älteste Erkrankung ist, so liegt die Annahme zunächst nahe, daß es sich hier um eine primäre Lungentuberkulose handelt. In Wirklichkeit ist es aber eine sekundäre Organerkrankung, die auf dem lympho-hämatogenem Wege entstanden ist (Abb. 3).



Abb. 3. Kaninchen 393, gefüttert mit 1,25 mg Perlsuchtkultur am 2. VII., tot am 23. XI. 1921. Die stark vergrößerte Lunge, durchsetzt mit tuberkulösen Herden, die kaum noch atmungsfähiges Lungengewebe dazwischen erkennen lassen. Die weißen Partien der Abbildung sind die tuberkulös veränderten Teile der Lunge. Unter der Nierenoberfläche vereinzelte Tuberkelknötchen. Präparat in Kaiserling.

Neben dieser Feststellung ist noch die Tatsache als ein wichtiges Resultat unserer Versuche zu verzeichnen, *daß eine Lungentuberkulose entstehen kann, ohne daß der Mechanismus der Fütterung oder der Inhalation dabei in Frage kommt.* Das beweisen die Versuche mit der conjunctivalen Infektion.

Man könnte hier noch die Frage aufwerfen, ob die Erkrankung der Lungen überhaupt als eine sekundäre aufzufassen ist, oder ob sie gleichzeitig oder sehr *kurze Zeit nach der Infektion* der Conjunctivalschleimhaut durch Einschwemmen von Bacillen in das Lymphgefäßsystem und die Blutbahn entsteht.

Um diesen Punkt zu klären, haben wir folgenden Versuch (Tab. V) angestellt: ein Meerschweinchen wurde sechs Stunden, ein anderes 24 Stunden nach stattgehabter conjunctivaler Infektion getötet. Die rechte und linke Lunge eines jeden Tieres wurde getrennt zu einem Brei verrieben, und dieses zertrümmerte Gewebe je einem Meerschwein-

chen subcutan einverleibt. Alle vier Tiere blieben gesund und zeigten vier Monate später bei der Obduktion nicht den geringsten pathologischen Befund. Daß in der Tat eine hinreichende conjunctivale Infektion erfolgt war, zeigte ein drittes, gleichzeitig mit den beiden Versuchstieren infiziertes Meerschweinchen, das in typischer Weise eine Halsdrüsentuberkulose mit tuberkulöser Milz- und Lungenerkrankung erwarb. In diesem Sinne kann auch der Versuch Nr. 1 (Tab. III) verwertet werden; bei diesem Tiere war neben der Halsdrüsentuberkulose 26 Tage nach der Infektion nur eine Milzerkrankung festzustellen, während die Lungen frei von Tuberkulose waren. Hier waren wohl Tuberkelbacillen von den erkrankten Halslymphdrüsen nur in die Milz, nicht in die Lungen verschleppt worden. Bei einem längeren Leben des Tieres würden sich wohl auch tuberkulöse Herde in den Lungen durch Verschleppen von Bacillen auf dem lympho-hämatogenen Wege entwickelt haben.

Denselben Versuch haben wir bei fünf Kaninchen angestellt. Die Resultate dieses Versuches (Tab. IV) unterscheiden sich von dem gleichsinnigen Meerschweinchenversuch dadurch, daß hier in keinem Falle sichtbare tuberkulöse Milzveränderungen gefunden wurden, was bei den Lungen von vier (Tab. IV) der Fall war.

Tier 1 (405) macht wohl deshalb eine Ausnahme, weil es nur kurze Zeit (17 Tage) gelebt hatte. Es zeigte nur eine tuberkulöse Conjunctivitis. Hätte es längere Zeit gelebt, so würde wohl auch die Drüsentuberkulose manifest geworden sein und von diesem tuberkulös erkrankten Herde eine Verschleppung der Tuberkelbacillen auf dem Wege der Blutbahn in Milz und Lunge stattgefunden haben. Zu bemerken wäre noch, daß bei Tier 404 auch tuberkulöse Knötchen unter der Nierenkapsel zur Entwicklung gelangt waren, ein pathologischer Befund, dessen Lokalisation für eine auf dem Blutwege erfolgte sekundäre Infektion der Tiere spricht.

Wir haben auch die *quantitativen Verhältnisse* bei der conjunctivalen Infektion geprüft. Welche Infektionsdosis ist notwendig, um eine Halsdrüsentuberkulose oder Lungentuberkulose zu erzielen? Bei dem Tiermangel mußten wir uns allerdings, wie überhaupt leider bei allen Versuchen, eine große Beschränkung auferlegen. Im ganzen haben wir acht Tiere mit fallenden Mengen von zehn zu zehn einer Tuberkelbacillenverreibung infiziert. Dazu kommen noch die Versuche mit Verdünnungen bis zu 2500 und 13 Keimen (Tab. III, Tiere 14, 15, 16. u. 17), die aus der folgenden Arbeit *Baumgartens* übernommen sind und die hier zweckmäßig als Beweismaterial verwendet werden können.

Bei einer solchen Dosierung ist allerdings zu beachten, daß von einer absoluten Zuverlässigkeit keine Rede sein kann. Vorausgesetzt. daß die Bacillenaufschwemmung eine vollständig gleichmäßige ist.



in Wirklichkeit ist sie es nicht, darf man nicht annehmen, daß die volle Infektionsdosis mit sämtlichen darin enthaltenen Bacillen, die auf das Auge geträufelt, von der Augenbindehaut resorbiert wird. Ein Teil wird wahrscheinlich durch den Tränennasenkanal abfließen, ein anderer Teil bleibt unresorbiert im Augenbindehautsack als Flüssigkeit stehen. Um nun eine möglichst große Menge von der Schleimhaut resorbieren zu lassen, haben wir die eingeträufelte Flüssigkeit regelmäßig 10 Minuten lang im Bindehautsack stehen lassen. Dabei machten wir die Beobachtung, daß der größte Teil nach dieser Zeit nicht aufgenommen war; die Resorption von Flüssigkeit durch die Conjunctivalschleimhaut hat also ihre natürlichen Grenzen. Es wird also nur ein geringer Teil der Tuberkelbacillen aufgenommen. Es wäre vielleicht angebracht, weitere Versuche mit getrockneten Tuberkelbacillenmengen anzustellen; dabei wären allerdings große Schwierigkeiten hinsichtlich der genauen Dosierung zu überwinden.

Trotz dieser Bedenken ergab die Infektion mit fallenden Mengen Anhaltspunkte dafür, daß bei der conjunctivalen Infektion die Abstufung der Infektionsdosis eine Rolle spielt. Bei zu geringer Dosis gibt es eine Grenze, bei der ein Erfolg ausbleiben kann.

Wie aus der Tabelle III hervorgeht, war eine Infektionsdosis von $^1/_{400}$ mg, nach *Findel* etwa 8750 Keime, nicht mehr imstande, eine Halsdrüsentuberkulose mit Sicherheit beim Meerschweinchen zu erzeugen. Dagegen wurden bei sämtlichen Tieren Lungenveränderungen festgestellt, die jedoch einige Besonderheiten zeigten. Während die Veränderungen bei sechs Tieren schon makroskopisch als sicher tuberkulös angesprochen werden konnten, da hier deutliche typische tuberkulöse Knötchen vorhanden waren, waren bei einzelnen Tieren, die mit den geringen Dosen (enthaltend etwa 8000—9000 und 2500 Keime) conjunctival infiziert worden waren, der tuberkulöse Charakter der Lungenveränderungen nicht ohne weiteres zu erkennen. Die Lungen wiesen besonders an den Spitzen und freien Rändern befindliche dunkelrote Partien auf, die den Eindruck von hepatisiertem, atelektatischem oder carnifiziertem Gewebe machten, meist im Niveau der Lungenoberfläche etwas tiefer lagen und sich oft sehr scharf von dem übrigen lufthaltigen Gewebe abgrenzten. Diese Stellen enthielten hier und da mit bloßem Auge eben sichtbare Knötchen, zuweilen konnte ihre tuberkulöse Natur aber erst durch die mikroskopische Untersuchung festgestellt werden. Allerdings konnten wir mit solchem Lungengewebe bei Verimpfung auf andere Meerschweinchen keine Tuberkulose erzeugen (z. B. bei dem Tiere 12, Tab. III); das ist wohl darauf zurückzuführen, daß die Zahl der Tuberkelbacillen so gering war, daß eine Infektion nicht mehr angehen konnte. Bei den Meerschweinchen, die mit der minimalen Dosis (13 Keime enthaltend) infiziert waren,

ließen sich makroskopisch zwar noch kleinste Tuberkelknötchen erkennen, aber ihre Zahl war sehr gering.

Als wichtigstes Resultat dieser Versuchsreihe verdient folgendes hervorgehoben zu werden. Bei conjunctivaler Infektion *mit sehr geringen Dosen braucht eine tuberkulöse Erkrankung der Augenbindehaut und des Halsdrüsenapparates nicht einzutreten, wenigstens keine makroskopische, während eine typische Tuberkelknötchenbildung in den Lungen vorhanden sein kann.* Ein solcher Befund war bei drei Tieren (13, 16 u. 17, Tab. III) vorhanden. Bei etwas größeren Dosen war auch die Milz erkrankt. Die spärliche Knötchenbildung in den Lungen entsprach der geringen Infektionsdosis. Es können also bei conjunctivaler Infektion die Eingangspforten und die entsprechenden Lymphbahnen von einer tuberkulösen Erkrankung verschont bleiben, obwohl sie doch offenbar von den Tuberkelbacillen passiert werden, während dagegen eine Ansiedelung der Bacillen in der Lunge zustande kommt. Daraus geht hervor, *daß die Lungen diejenigen Körperorgane sind,* die für die Seßhaftmachung der Tuberkelbacillen am meisten disponiert sind, mit anderen Worten: *eine Lungentuberkulose kann entstehen, gleichgültig an welcher Stelle der Tuberkelbacillus in den Organismus eindringt, eine solche Lungentuberkulose kommt auf dem lymphohämatogenen Wege zustande.*

*Zusammenfassung.*

Vermittels einer einfachen Versuchsanordnung, Einträufelung einer Bacillenemulsion in die Mundhöhle, kann bei Meerschweinchen und Kaninchen ein typisches Krankheitsbild, nämlich eine Halsdrüsen- und Lungentuberkulose erzeugt werden. Die Halsdrüsenerkrankung gleicht der menschlichen Halsdrüsentuberkulose oder Skrofulose.

Es sind fast stets dieselben Drüsen, die zu erkranken pflegen, nämlich die Submental-, Submaxillar- und die tiefen Halslymphdrüsen. Die Hyperplasie der letztgenannten Drüsengruppe ist besonders beim Meerschweinchen sehr ausgesprochen und charakteristisch.

Diese pathologischen Befunde beweisen, daß ein Teil der in die Mund- und Rachenhöhle eingeführten Bacillen schon im oberen Teile des Verdauungstraktus von der Mund- und Rachenschleimhaut aufgenommen und resorbiert werden kann.

Die Resorption geht auf dem Wege der Lymphbahnen vor sich. Diejenigen der Mund- und Rachenschleimhaut führen ihre Lymphe über die Submental-, Submaxillar- und die tiefen Halslymphdrüsen, weiter durch den Ductus cervicalis in die Vena cava superior und damit in den Blutkreislauf. Auf dem lympho-hämatogenen Wege gelangen sie also in das rechte Herz und von da in die Lunge. Eine Weiterleitung von Keimen auf direktem Wege von den Halslymphdrüsen zu denen





der tracheo-bronchialen Gruppe ist nicht möglich, da keine Verbindung zwischen beiden besteht. Die Ergebnisse der normalen Anatomie über den Verlauf der Lymphbahnen des Kopfes und Halses beim Menschen und den kleinen Versuchstieren, Meerschweinchen und Kaninchen, entsprechen unseren pathologischen Befunden.

In ähnlicher Weise wie die Entstehung der experimentellen Halsdrüsentuberkulose dürfen wir uns auch die der menschlichen Halsdrüsenerkrankung oder Skrofulose vorstellen. Denn die orale Infektion stellt einen Infektionsmechanismus dar, der der Schmutz- und Schmierinfektion gleicht. Die Mund- und Rachenhöhle bildet die Eingangspforte für die auf diese Weise in den oberen Teil des Verdauungstraktus gelangten Bacillen, vorausgesetzt, daß sie nicht gleich verschluckt werden, sondern einige Zeit auf der Schleimhaut verweilen und so die Möglichkeit haben, von den Lymphbahnen resorbiert zu werden.

Dasselbe Bild der Halsdrüsentuberkulose und die wahrscheinlich sekundär sich entwickelnde Lungenerkrankung entsteht, wenn die Infektion von der Augenbindehaut aus erfolgt.

Das bestätigt wiederum die Feststellung der normalen Anatomen (*Most*), daß die gesamte Lymphe des Kopfes durch die Lymphgefäße des Halses in die Vene abfließt.

Man darf wohl annehmen, daß die Tuberkelbacillen auch unter natürlichen Verhältnissen öfter als wir bisher angenommen haben, durch die Schleimhaut des Augenbindehautsackes in den menschlichen Organismus gelangen.

Werden die Augenbindehäute mit sehr geringen Mengen von Tuberkelbacillen infiziert, so können die wenigen Keime die Drüsenfilter passieren, ohne eine sichtbare Erkrankung der Halsdrüsen zu verursachen, während sich aus den von den Endothelien der Lungencapillaren abgefangenen Bacillen typische Tuberkelknötchen entwickeln können.

Die Lunge ist also dasjenige Organ, in denen die Bacillen am ehesten haften; eine isolierte Lungentuberkulose kann die Folge sein, gleichviel an welcher Stelle die Aufnahme der Bacillen in den Organismus stattgefunden hat. In die Lunge geraten sie also in diesen Fällen auf dem lympho-hämatogenen Wege.

Unsere Versuche mit der conjunctivalen Infektion haben endlich mit Sicherheit bewiesen, daß eine isolierte Lungentuberkulose erzeugt werden kann, ohne daß der Mechanismus der Fütterung und der Inhalation dabei eine Rolle spielt.





(Aus dem Institut „Robert Koch". Berlin [Abteilung Prof. Dr. *Jos. Koch*].)

# Vergleichende experimentelle Untersuchungen über die Entstehung der Lungentuberkulose durch Fütterung (orale Infektion) und Inhalation.

Von
Dr. **W. Baumgarten,**
Direktor des Staatl. Medizinaluntersuchungsamts Trier, früh. Assistent des Instituts.

Die Klärung der Frage der Entstehung der Lungentuberkulose hat in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte gemacht, endgültig entschieden ist sie jedoch keineswegs. Es spricht für die Schwierigkeit des Problems, daß immer wieder neue Arbeiten sich mit ihm befassen, und der Streit nicht zur Ruhe kommen will. Wir hatten anfänglich nicht die Absicht, uns daran zu beteiligen, aber die Ergebnisse unserer Arbeit über die Entstehung der Halsdrüsentuberkulose, der Nachweis des starken Resorptionsvermögens des oberen Teiles des Intestinaltraktus, der Mund- und Rachenschleimhaut, die Feststellung der Quell- und Abflußgebiete der Lymphbahnen, die bei der Aufnahme und Weiterleitung der in den Nasenrachenraum inhalierten, in die Mund- und Rachenhöhle eingeführten Tuberkelbacillen in Betracht kamen, brachten uns immer wieder in enge Berührung mit der Hauptfrage des Tuberkuloseproblems: der Entstehung der Lungentuberkulose. Wir konnten ihr nicht ausweichen und sahen uns gezwungen, auch zu dieser wichtigen Frage Stellung zu nehmen.

Die Entwicklung der Streitfrage, ob die Lungentuberkulose auf Inhalation oder Fütterung zurückzuführen ist, ausführlich zu schildern, halten wir für überflüssig; das ist bereits von einer größeren Anzahl von Autoren geschehen. Wer sich darüber genauer unterrichten will, den verweisen wir auf die eingehenden Referate der VI. Internationalen Tuberkulose-Konferenz zu Wien vom 19. bis 21. IX. 1907 mit den Referaten von *Weichselbaum*, *Calmette*, *Flügge*, *Orth*, *A. Weber*, *Bartel*, *Weleminsky*, *Most* usw.; auf *Römer*, Die Ansteckungswege der Tuberkulose, Handbuch der Tuberkulose von *Brauer*, *Schröder* und *Blumenfeld*, I., 247; *Calmette*, L'Infection bacillaire et la Tuberculose, Masson et Cie., Paris 1920; *v. Behring*, Tuberkulosebekämpfung (Vortrag gehalten auf der 75. Versammlung der Naturforscher und Ärzte am 25. IX. 1903



in Kassel; *N. G. Elwert, Marburg, Flügge*, Die Verbreitungsweise und Bekämpfung der Tuberkulose, Leipzig, Veit und Co., 1908, mit den Arbeiten von *Findel, B. Heymann, Reichenbach* usw.; *Weleminsky*, Zur Pathogenese der Lungentuberkulose, Berl. klin. Wochenschr. 1903, Nr. 37; ebenda 1905, Nr. 24, Nr. 31 und 32; ebendort 1907, Nr. 10; *Beitzke*, Über den Verlauf der Impftuberkulose beim Meerschweinchen. Berl. klin. Wochenschr. 1907, Nr. 2; *Hara*, Experimentelle Kritik zur Frage der Inhalationstuberkulose des Meerschweinchens usw. in *P. v. Baumgarten*, Arbeiten auf dem Gebiete der pathol. Anatomie und Bakteriologie 7, 436; *Bartel* und *Spieler*, Der Gang der natürlichen Tuberkulose-Infektion beim jungen Meerschweinchen. Wiener klin. Wochenschr. 1905, Nr. 9; *Bartel* und *Neumann*, Über experimentelle Inhalationstuberkulose beim Meerschweinchen. Ebendort 1906, Nr. 7 und 8; *Cornet*, Die Tuberkulose. A. Hölder, Wien 1907; *R. Pfeiffer* und *Friedberger*; Vergleichende Untersuchungen über die Bedeutung der Atmungsorgane und des Verdauungstraktus für die Tuberkulose-infektion nach Versuchen am Meerschweinchen. Dtsch. med. Wochenschr. 1907, Nr. 39 und andere.

Zweckmäßiger erscheint es uns, in kurzen Ausführungen ein Bild vom augenblicklichen Stande des noch unentschiedenen Problems zu entwerfen.

Die sehr alte Streitfrage kam bekanntlich von neuem in Fluß, als *v. Behring* auf dem Naturforscher- und Ärztetag zu Kassel am 25. IX. 1903 behauptete, daß der Mensch schon im Säuglingsalter den Keim der Tuberkulose mit der Milch perlsüchtiger Kühe aufnehme. Die Tuberkulose entstehe also auf dem Wege des Digestionstraktus, die Inhalation spiele keine Rolle. Tatsächlich sei auch die sog. Inhalationstuberkulose als eine intestinale Infektion anzusehen. Darüber äußert er sich in folgender Weise: „Vorweg ist der vielfach bis vor kurzem verbreitete Irrtum zurückzuweisen, daß die auf dem Inhalationswege durch den Mund und die Nase in den Nasenrachenraum gelangten Tuberkelbacillen auf respiratorischem Wege in das Lungengewebe hineingelangen müßten. Experimentelle und klinische Erfahrungen liefern vielmehr den Beweis, daß die inhalierten Bacillen hauptsächlich oder ausschließlich durch die Leukocyten der intestinalen Lymphfollikel in die Lymphbahnen und von hieraus entweder in die Blutbahn transportiert werden können oder zu lokalisierter Lymphdrüsen-Tuberkulose führen“[1]).

Ebenso entschieden ist auf französischer Seite *Calmette*[2]) mit seinen Mitarbeitern *Guérin, Breton* für die Bedeutung des Verdauungskanales

[1]) Heft 9 „Tuberkulosis“ 1907.

[2]) L'Infection bacillaire et la Tuberculose chez l'homme et chez les animaux. Masson et Cie., Paris 1920.



als Eintrittspforte für die Tuberkelbacillen eingetreten. Er stützt sich hauptsächlich auf seine Versuche an Ziegen, durch welche er zeigen konnte, daß vor allem junge Tiere durch Sondenfütterung leicht eine Lungentuberkulose erwerben. Nach seinen Feststellungen durchwandert der Tuberkelbacillus die Schleimhaut des Darmes, ohne dort sichtbare Veränderungen zu hinterlassen. Die Bacillen siedeln sich dann in den Mesenterialdrüsen an, erzeugen dort primäre Herde, von denen dann sekundär die Bacillen sehr leicht in das Blut und mit dem Blutstrom in die Lungen gelangen sollen. Nach *Calmette* wäre die Lungenerkrankung also als eine sekundäre, auf dem Blutwege entstandene Erkrankung aufzufassen. Eine direkte Infektion der Lunge durch Einatmung lehnt er ab und behauptet, daß auch die Lungenanthrakose auf demselben Wege wie die Tuberkulose entstehe.

Der Standpunkt der bisher genannten Autoren ist von *Flügge*[1]) und seinen Mitarbeitern *Findel*, *Br. Heymann*, *Reichenbach*, *Alexander*, ebenso von *Richard Pfeiffer* und *Friedberger*[2]), alle entschiedene Anhänger der Inhalationstheorie, nachdrücklich bekämpft worden. Die zahlreichen und sorgfältigen Arbeiten des Breslauer Hygienischen Instituts haben unsere Kenntnisse über die Ansteckungswege der Tuberkulose im allgemeinen sehr gefördert und zur Klärung der Ansichten erheblich beigetragen. Aufgebaut sind die Arbeiten auf der Tröpfcheninfektionstheorie *Flügges*, deren Hauptsätze hier wiedergegeben sein mögen:

Feine bacillenhaltige, in der Luft schwebende Tröpfchen können unter natürlichen Verhältnissen durch Einatmen unmittelbar bis in die Lungenalveolen gelangen.

Die Inhalation verstäubter, tuberkelbacillenhaltiger Tröpfchen des Sputums führt im Tierexperiment stets zur Entwicklung zahlreicher Knötchen in der Lunge. Die verstäubten Sputumteilchen müssen also als feinste Tröpfchen bis in die letzten Bronchien und Alveolen eingeatmet sein, wo sie primäre Tuberkelknötchen erzeugen.

Bei der Verfütterung von Tuberkelbacillen an die verschiedensten Versuchstiere, ein Infektionsmechanismus, bei dem die Bacillen vom Darm oder vom Rachen aus in den Organismus eindringen, sind millionenfach größere Bacillenmengen notwendig, um manifeste tuberkulöse Veränderungen hervorzurufen.

Da der Mensch, der Gefahr des Einatmens der vom Phthisiker oft in großen Mengen ausgehusteten und der Luft seiner nächsten Umgebung beigemischten tuberkelbacillenhaltigen Tröpfchen oder des

[1]) Die Verbreitungsweise und Bekämpfung der Tuberkulose auf Grund experimenteller Untersuchungen im hygienischen Institut der Königl. Universität Breslau 1897—1908.

[2]) Dtsch. med. Wochenschr. 1907, Nr. 39.





Sputumstaubes sehr häufig ausgesetzt ist, so stellt dieser Infektionsmechanismus die wesentlichste Infektionsgelegenheit dar; die Gefahr wird dadurch gesteigert, daß im Tierexperiment schon eine außerordentlich kleine Menge von Bacillen eine sichere Infektion vermittelt.

Durch die experimentellen vergleichenden Untersuchungen *Findels*[1]) wurde insofern ein neuer Gesichtspunkt in den Vordergrund der Streitfrage gerückt, als er auf den Einfluß der Mengenverhältnisse der Infektionsdosis bei der Inhalation und Fütterung aufmerksam machte. *Flügge* und *Findel* leugnen keineswegs die Möglichkeit der Entstehung einer Lungentuberkulose durch Fütterung, betonen aber, daß zu einer solchen eine mindestens tausendfach größere Dosis erforderlich sei als bei Versuchen, in denen die Versuchstiere einem Nebel feinversprayter Tuberkelbacillen ausgesetzt werden. Da *Findel* durch eine sinnreiche Versuchsanordnung die Zahl der zur Einatmung gelangenden Bacillen anscheinend genau feststellen konnte, schien ein exakter Beweis für die Bedeutung der quantitativen Verhältnisse erbracht zu sein.

Ohne Zweifel zeichnet sich die Inhalationstheorie durch Einfachheit und Klarheit aus; dadurch erklärt sich ihre günstige Aufnahme und die allgemeinere Anerkennung, die sie gefunden hat. Sie setzt keine anatomischen Kenntnisse der immerhin komplizierten Lymphgefäßverhältnisse der Schleimhäute des oberen Respirations- und Digestionstraktus voraus, die in erster Linie die Aufnahme der Bacillen besorgen und legt auf die anatomischen und physiologischen Verhältnisse weniger Gewicht. Manche Vertreter der Inhalationstheorie berücksichtigen überhaupt nicht, andere in nicht genügender Weise das pathologische Verhalten der einzelnen Organe, die Lymphgefäßverhältnisse der Schleimhäute, die Lymphdrüsenveränderungen, besonders der Submaxillar- und Halsdrüsen. *Flügge* hat allerdings in seinen Arbeiten darauf aufmerksam gemacht, daß Tuberkelbacillen gelegentlich auch von der Mundschleimhaut und den Rachenadnexen in den menschlichen Organismus einwandern und eine Halsdrüsentuberkulose erzeugen können. Wenn er aber dieser Tatsache keine entscheidende Bedeutung für die Streitfrage beigemessen hat, so lag es wohl daran, daß die Lymphgefäßbahnen des oberen Teiles des Verdauungstraktus als Infektionswege der Tuberkulose damals noch nicht genügend erforscht waren.

Eingehender haben sich die pathologischen Anatomen mit diesen Verhältnissen beschäftigt und nicht nur die physikalisch-theoretische Seite der Frage der Möglichkeit und praktischen Bedeutung des Hineingelangens von Bacillen unmittelbar bis in die feinsten Alveolen, sondern vor allem auch die anatomisch-pathologischen Befunde der

[1]) Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 57. 1907.



einer Inhalation eines fein versprayten bacillenartigen Nebels ausgesetzten Versuchstieres genauer festgestellt und gewürdigt. An dieser Arbeit haben sich vor allem *Weichselbaum*[1]) und seine Mitarbeiter *Bartel*[2]) und *Spieler*, ferner *P. von Baumgarten*[3]) und sein Mitarbeiter *Hara* beteiligt. *Weichselbaum* faßt das Ergebnis seiner und seiner Mitarbeiter Untersuchungen dahin zusammen, daß wir die von *v. Behring* aufgerollte Streitfrage zwar jetzt noch nicht entscheiden können, daß man aber wohl schon jetzt behaupten dürfe, die Fütterungs- bzw. Deglutitionstuberkulose komme beim Menschen, besonders im Kindesalter, viel häufiger vor, als bis vor kurzem noch die meisten Forscher geglaubt hätten. Bei diesem Infektionsmodus könne aber das Eindringen der Tuberkelbacillen nicht bloß vom Magen- und Darm-, sondern auch von der Mund-, Nasen- und Rachenschleimhaut, und zwar gleichzeitig von allen diesen Stellen erfolgen, gleichgültig, ob die Bacillen mit der Nahrung oder sonstigen Ingesta oder mit der Atemluft oder auf andere Weise in die genannten Höhlen gelangt seien. In den betreffenden Schleimhäuten und auch in den regionären Lymphdrüsen brauche es nicht sogleich oder überhaupt nicht zu manifesten bzw. spezifisch tuberkulösen Veränderungen zu kommen, sondern die Wirkung der Tuberkelbacillen könne sich zunächst in der Erzeugung der sog. lymphoiden Tuberkulose äußern, deren Dauer verschieden lang sein könne, und die schließlich entweder ganz zurückgehe oder nach erneuter Infektion, aber auch ohne eine solche, zu spezifisch tuberkulösen bzw. manifesten Veränderungen führe, sei es an der Eintrittspforte oder in den Lungen- und Bronchialdrüsen oder in anderen Organen. (Siehe S. 31 der Verhandlungen der VI. Internationalen Tuberkulose-Konferenz zu Wien vom 19. bis 21. IX. 1907.)

Die bedeutendste und eingehendste Kritik der Inhalationstheorie der letzten Zeit stammt aus dem Pathologischen Institut zu Tübingen. *Hara*[4]) ist der Überzeugung, daß *Findel* zu einer anderen Deutung seiner Versuche gekommen wäre, wenn er die wiederholt in seinen Protokollen notierten Schwellungen und Verkäsungen der Submental- und Halsdrüsen berücksichtigt hätte. *Hara* selbst konnte bei allen seinen Inhalationstieren eine Tuberkulose dieser Drüsen, mindestens aber auch bei anscheinend normalem Aussehen in ihnen Tuberkelbacillen nachweisen. In $^2/_3$ dieser Fälle gelang ihm der Nachweis von Tuberkelbacillen auch in der anscheinend normalen Rachenschleimhaut, abgesehen von 3 weiteren Fällen, bei denen sich tuberkulöse Geschwürsbildungen vorfanden. Er sah überhaupt, besonders bei

---

[1]) Referat auf der VI. Internat. Tub.-Konf. Wien, 19.—21. Sept. 1907.

[2]) Wiener klin. Wochenschr. 1905 und Klin. Jahrbuch **14**. 1905.

[3]) *Baumgarten*, Arb. a. d. Geb. d. pathol. Anat. u. Bakt. **7**. 1911.

[4]) *P. v. Baumgarten*, Arb. a. d. Geb. d. pathol. Anat. u. Bakt. **7**, 436. 1911.

einer Inhalation nicht allzu zahlreicher Bacillen, die Submental- und Halsdrüsen verhältnismäßig früh als die ersten Organe nächst den tracheobronchialen Drüsen, auf alle Fälle aber früher als die Lungen tuberkulös erkranken. Ebenso deutet er die bei Inhalationsversuchen mit größeren Mengen zur Entwicklung gelangende Lungentuberkulose als eine sekundäre, im Verlauf einer allgemeinen, bei massenhafter Inhalation sogar akuten Miliartuberkulose sich ausbildende Erkrankung. Diese Anschauung, daß es bei Inhalationsversuchen zu einer Durchseuchung des ganzen Körpers kommt, sieht er durch die Befunde von Tuberkelbacillen in Inguinal-, Portal- und Achseldrüsen, gelegentlich auch Mesenterialdrüsen bestätigt. Bei der Inhalation versprayter corpusculärer Farbstoffelemente bleibt nach Versuchen *Haras* die Hauptmasse in der Nasen- und Mundhöhle haften; es sind also nicht die Alveolen, sondern die Nasen-, Mund- und Rachenschleimhaut als Eintrittspforten anzusehen, während man den geringen Mengen tatsächlich in die Alveolen eindringender Keime eine praktische Bedeutung nicht beizumessen brauche. Denn einmal dürfte durch den Hustenstoß eines Phthisikers niemals ein ähnlich fein verteilter Bacillennebel wie mit dem Buchner-Spray erzeugt werden, und zweitens sei es nicht möglich, auf dieselbe Weise unverdünntes Phthisikersputum überhaupt, ein im Verhältnis 1:10 verdünntes Sputum nur auf sehr geringe Entfernung zu versprayen. Sogar die Infektion mit Reinkulturen gelang *Hara* im Inhalationsversuch nicht, wenn die Tiere im Freien saßen; nur bei Versprayung von Reinkulturen in einen Kasten, in dem die Tiere eingesperrt waren, ließ sich ein positives Ergebnis, und zwar bei Meerschweinchen eine allgemeine Infektion erzielen. Entscheidenden Wert legt schließlich *Hara* auf die Feststellung, daß es ihm niemals gelang, bei sofort nach der Inhalation getöteten Tieren in den Lungen Tuberkelbacillen nachzuweisen.

Auf Grund seiner Versuche gelangt *Hara* „bezüglich des Wesens der experimentellen Inhalationstuberkulose zu dem Schlusse, daß dieselbe in den meisten Fällen nichts anderes ist als das Resultat einer Kontaktinfektion auf der breiten Basis der Schleimhäute der oberen Wege"[1]). In seiner kritischen Schlußbetrachtung über die Lehre der Inhalationstuberkulose stellt er den von *Flügge* betonten und durch *Findel* anscheinend bewiesenen quantitativen Verhältnissen bei der Fütterung und Inhalation folgende Erwägung gegenüber: „Die schwerlöslichen Verbände der Tuberkelbacillen in künstlichen Kulturen derselben, sowie der im Sputumballen vorhandenen Bacillenklümpchen bilden ein großes Hindernis für die feine Homogenisierung durch künstliche Zerreibung usw. Bei der Verfütterung werden nun solche klumpige Bacillenkonglomerate mit der Aufschwemmung in wenigen Sekunden

[1]) *P. v. Baumgarten*, Arb. a. d. Geb. d. pathol. Anat. u. Bakt. 7, 476. 1911.





von den hungrigen Tieren rasch hinuntergeschluckt, so daß die verschluckten Tuberkelbacillenkonglomerate mit den Schleimhäuten des Verdauungstraktus, insbesondere mit der Rachenschleimhaut, nur ganz kurze Zeit in Berührung kommen. Dagegen wird bei den Inhalationsversuchen ein feiner Bacillennebel nicht nur mit der Rachenschleimhaut, sondern auch mit den Schleimhäuten der Nasenhöhle, der Mundhöhle usw. minuten- bis stundenlang in innigstem Kontakt bleiben, dementsprechend von dort resorbiert und außerdem von den angehefteten Tuberkelbacillen ein Teil allmählich nach dem Magendarmkanal hinuntergeschluckt werden [1])."

Wir haben nicht die Absicht, in eine eingehende Kritik der „Tröpfcheninfektion" einzutreten; man kann sie wohl als den *Angelpunkt der Inhalationstheorie* bezeichnen. Es gibt Anhänger und Gegner derselben; ihre Zahl hält sich ungefähr die Wage. In seiner kritischen Besprechung faßt *Hara* sein Urteil über diesen Kardinalpunkt dahin zusammen: „daß die bisherigen Experimente, welche die direkte Ansteckung der Lunge durch inhalierte Bacillen beweisen sollen, nicht absolut beweiskräftig sind"[2]). Viele Experimentatoren hätten die Tiere erst nach Verlauf einer ziemlich langdauernden Pause nach der Inhalation durch Narkose, Nackenschlag, Strangulation usw. getötet; aber durch die unvermeidlichen tiefen agonalen Inspirationen der Tiere sei die Möglichkeit vorhanden gewesen, daß die Keime nach unten aspiriert wurden. Eine künstliche Aspiration der Keime sei in diesen Fällen mit Sicherheit nicht auszuschließen.

Auch in den *B. Heymann*schen[3]) Versuchen kann *Hara* keine vollgültigen Beweise dafür erblicken, daß die experimentell verspritzten, mit Tuberkelbacillen beladenen Tröpfchen nur durch den Akt der Einatmung bis in die tiefsten Teile des Respirationstraktus geraten können. *Heymann* tötete seine Tiere nach vollendeter Inhalation einer ziemlich konzentrierten Aufschwemmung im *Findel*schen Apparat nach 1—12, 24, 72, und 144 Stunden durch Nackenschlag; der zerriebene Lungenbrei wurde dann auf andere Tiere verimpft. Nicht nur diese Tiere erkrankten ohne Ausnahme, sondern auch die mit Bronchialdrüsenbrei infizierten, die inhaliert hatten. Auf Grund dieser Versuche sagt *Heymann*: „Es ist demnach mit völliger Eindeutigkeit erwiesen, daß inhalierte Tuberkelbacillen mit Leichtigkeit auf direktem Wege in die Lunge gelangen." Demgegenüber meint *Hara*, daß sowohl Aspiration der in der Rachenhöhle hängengebliebenen Keime statt-

---

[1]) *P. v. Baumgarten*, Arb. a. d. Geb. d. pathol. Anat. u. Bakt. **7**, 475. 1911.

[2]) Ebendort S. 446.

[3]) *B. Heymann*, Versuche an Meerschweinchen über die Aufnahme inhalierter Tuberkelbacillen in die Lunge. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. **60**, Heft 3, S. 490. 1908.



gefunden haben könne als auch ein lymphohämatogener Transport der Keime in die Lungen nicht sicher auszuschließen sei, weil die Tiere nicht sofort, sondern erst nach mehr oder minder langer Zeit nach der Inhalation getötet worden seien. Wenn aber schon das direkte Eindringen von verstäubten Tuberkelbacillen bei künstlicher Inhalation zweifelhaft sei, wieviel mehr müsse man zweifeln, ob die beim Husten, Sprechen usw. verspritzten Tröpfchen der Phthisiker direkt in die Lungen anderer Menschen gelangten.

Fraglos ist dem Nachweis von künstlich versprayten Tuberkelbacillen in der Lunge der Versuchstiere eine Stunde nach Beendigung der Inhalation eine hohe Bedeutung und eine starke Beweiskraft beizumessen; zwingend ist dieser Beweis aber nicht. Ein solcher Befund läßt sich auch noch anders erklären; die Bacillen können noch auf einem anderen Wege in die Lunge gelangen, wie wir im Verlaufe der weiteren Ausführungen zeigen werden.

### *Eigene Versuche.*

Sie bestanden darin, daß wir eine Reihe von Meerschweinchen einen Nebel mit dem Buchner-Spray verstäubter Tuberkelbacillen einatmen ließen. Für die vergleichenden Fütterungsversuche standen uns die zahlreichen Tiere zur Verfügung, deren Befunde wir in der vorhergehenden Arbeit besprochen und gewürdigt haben.

Was die Technik anbelangt, so benutzten wir denselben Inhalationsturm, den *Findel* in seiner Arbeit beschrieben und mit einem Bilde erläutert hat. Die Technik war also ganz diejenige *Findels*[1]).

Auch für die *Berechnung* der zur Inhalation gelangenden Keime haben wir uns an die Angaben *Findels* gehalten, ohne damit entscheiden zu wollen, ob sie zutreffen oder nicht (s. auch die vorhergehende Arbeit S. 479). Hiernach legten wir als Zahl der Tuberkelbacillen, die 1 mg oberflächlich getrockneter, d. h. durch Pressen mit dem Platinspatel von überschüssiger Flüssigkeit befreiter Kulturmasse enthält, 35 Millionen zugrunde. Diese (von etwa 4 Wochen alten Glycerinbouillonkulturen stammende) Kulturmasse wurde im Achatmörser mit Kochsalzlösung sorgfältig verrieben, so daß z. B. in den ersten Versuchen 1 ccm der Verreibung 175 Millionen Keime enthielt. Von dieser Verreibung wurden — unter Anlehnung an die *Findel*sche Berechnung — vermittels einer Fahrradpumpe, welche mit einem Kolbenstoß 115 ccm Luft beförderte, mit 60 Kolbenstößen in 1 Minute in einem Buchner-Spray 0,11 ccm Verreibung in Nebelform versprayt. Diese Zahlen genügten zur Berechnung, wieviel Tuberkelbacillen in einer Raumeinheit Luft nach der Versprayung enthalten sind, d. h. in dem Augenblick, in dem der bacillenhaltige Luftstrom in dem unteren Teil des Inhalationsturmes eintritt. Beim Aufsteigen des Luftstromes in den oberen Teil des Turmes, in dem sich die Versuchstiere befinden, gehen 75% der Keime verloren. Unter Berücksichtigung dieses Verlustes läßt sich nun für jedes einzelne Versuchstier die Zahl von Tuberkelbacillen bestimmen, die mit der Atemluft einverleibt werden, wenn man für die in einer Zeit-

[1]) Der Inhalationsturm war uns in liebenswürdigster Weise von Herrn Prof. *B. Heymann* überlassen, wofür wir ihm an dieser Stelle verbindlichst danken.

einheit von einem Meerschweinchen verbrauchte Atemluft die von *Findel* bestimmten Mittelwerte zugrunde legt. Danach beträgt:

das Atemvolumen p. m. 290 ccm bei einem Meerschweinchen von 210 g Gewicht,
das Atemvolumen p. m. 333 ccm bei einem Meerschweinchen von 325 g Gewicht,
das Atemvolumen p. m. 357 ccm bei einem Meerschweinchen von 625 g Gewicht.

Da bei den Inhalationsversuchen eine Infektion der Augenbindehaut immerhin mit im Spiele sein konnte, haben wir die Versuche bei einzelnen Tieren modifiziert und durch Verschluß die Conjunctiven der Augen als Eintrittspforte für die Tuberkelbacillen ausgeschaltet.

Diesen Abschluß der Augenbindehaut gegen den Spraynebel der Bacillenemulsion machten wir in der Weise, daß wir den Tieren Hauben aus Mosettigbattist mit einem Ausschnitt für Nase und Schnauze über den Kopf zogen, welche den Zutritt der Atmungsluft zu den Respirationsorganen unbehindert gestattete. An den dem Fell anliegenden Stellen waren die Hauben mit Vaseline abgedichtet.

Unterschiede zwischen den Tieren mit und denen ohne Schutz der Augen waren jedoch nicht festzustellen.

Zur leichteren Übersicht und um Wiederholungen zu vermeiden, haben wir die Ergebnisse der Versuche auf den Tabellen Nr. I u. II wiedergegeben.

Die Tabellen der Inhalationsversuche lassen folgendes erkennen:

Bei 17 von 18 Tieren waren Lungenveränderungen vorhanden; bei 11 Tieren waren es ausschließlich die Lungen, die krankhafte Veränderungen zeigten. Ohne jeden Befund war das Tier Nr. 1. Warum dieser Versuch versagte, können wir nicht angeben. Bei vier Tieren waren außer den Lungen auch die Halslymphdrüsen (Tier 7, 8, 12 und 18) und bei einem weiteren Tier (Tier 11) die Milz und die Leber tuberkulös verändert, bei drei Tieren der Tabelle (2, 11 und 18) außer den Lungen nur die Milz. Die Tuberkulose des Tieres 15 kann man als eine allgemeine der inneren Organe bezeichnen, denn hier war nicht nur eine reichliche Tuberkeleruption in den Lungen, sondern auch eine sehr starke Vergrößerung der Milz und Leber festzustellen. *Diese Versuche beweisen, daß die Inhalation eines feinen bacillenhaltigen Nebels auch zu einer tuberkulösen Allgemeininfektion führen kann, ein Befund, den auch andere Untersucher erwähnen.* Im ganzen zeigten also 67% der Tiere ausschließlich Lungenveränderungen.

Das pathologisch-anatomische Bild der Lungen war kein einheitliches. Eine gleichmäßige Verteilung von Tuberkelknötchen über die ganze Lunge war bei keinem Tiere vorhanden; bei der Mehrzahl waren nur spärliche miliare Knötchen in den Lungen nachweisbar. Außer diesen spezifischen Knötchen wiesen die vergrößerten Lungen aber andere pathologische Veränderungen auf, die als dunkelrote, unter dem Niveau der übrigen lufthaltigen Lungenoberfläche liegende, scheinbar hepatisierte Bezirke erschienen. Hauptsächlich waren die Spitzen und die freien Ränder der Sitz des Krankheitsprozesses. Manche hatten Ähn-



lichkeit mit Infarkten oder atelektatischen Herden von sehr unregelmäßiger Gestalt und Größe. In ihnen waren nicht selten kleinste Tuberkelknötchen durch ihre grauweiße Farbe zu erkennen. Diese dunkelroten Herde, die manchmal einen größeren Teil, z. B. den ganzen rechten Oberlappen einnahmen, und sich oft scharf gegen das übrige lufthaltige Gewebe abhoben, sind sicher keine Kunstprodukte, die etwa durch die Chloroformnarkose herbeigeführt waren, die wir zur Tötung der Tiere anwandten. Denn bei Tieren, die nichts mit einer tuberkulösen Infektion zu tun hatten, und in gleicher Weise getötet wurden, haben wir sie nie gesehen. Sie sind also als eine Folge der tukerbulösen Infektion aufzufassen. Diese Ansicht wird auch rückhaltlos durch die mikroskopische Untersuchung solcher Lungenbezirke unterstützt. Sie erstreckte sich aber auch auf solche Lungen, die meist beträchtlich vergrößert, wie marmoriert aussahen, in denen normale lufthaltige Teile mit entzündlich veränderten Partien von braunroter Farbe abwechselten. Einen solchen Befund trifft man nicht selten bei Tieren an, die mit sehr geringen Dosen infiziert sind, gleichgültig, ob diese inhaliert, durch orale oder conjunctivale Infektion in den Organismus gelangten.

Am meisten fällt im mikroskopischen Bilde dieser, vor allem aber der scheinbar hepatisierten Teile die Verdickung der Alveolarwände der einzelnen Lungenbläschen auf. Während diese bei der normalen Meerschweinchenlunge sehr feine Scheidewände darstellen, sind sie hier verbreitert und verdickt. Die in den Alveolarsepten verlaufenden Capillaren sind nicht nur in ihrem Verlaufe deutlich sichtbar, sondern auch stark mit roten Blutkörperchen gefüllt. Der Verlauf ist vielfach geschlängelt. Teile des Gefäßrohres buchten sich in das Innere des Bläschens vor. Soweit dieser Befund vorhanden, handelt es sich um eine einfache, wenn auch starke Hyperämie der in den Alveolarwänden verlaufenden Capillarschlingen, wodurch diese breiter und dicker werden. Als *zweites Stadium* der Veränderung könnte man jenes bezeichnen, in dem bereits eine Vermehrung der zelligen Elemente der Alveolarwände eingetreten ist, die an vereinzelten Stellen in der Form kleinster rundlicher Zellanhäufungen sichtbar ist, an anderen aber auf größere Strecken eine gleichmäßige Verdickung der Alveolarwand herbeiführen. Erstreckt sich diese zellige Wucherung der Alveolarsepten über einen größeren Bezirk, so kommt es zu einer Verkleinerung der lufthaltigen Räume, zu einer Verödung der Lungenbläschen. Solche Herde machen dann den Eindruck, als habe hier eine Hepatisation[1]), eine Ausfüllung der Lungenbläschen mit zelligem Inhalt stattgefunden.

[1]) Wenn wir in den Protokollen von einer *Hepatisation* des Lungengewebes sprechen, so ist dieser Ausdruck nicht ganz korrekt; zutreffender wäre die Bezeichnung „scheinbare Hepatisation".



*Tabelle I. Inhalationsversuche*

Kultur: Glycerinbouillonkultur vom Stamm Typ. human. Neugebauer, hiervon mit einer Fahrradpumpe bedienten Buchnerspray verstäubt; der Spraynebel Teil mittelst Wasserstrahlluftpumpe abgesaugt. Diesem unter einem Unterdruck die Meerschweinchen ausgesetzt, und zwar im Versuch I ein Tier nach dem Nr. 8 mit 10). Tier 3 bis 6 wird zum Schutz der Augen in der beschriebenen nach den angegebenen Zeiten getötet: Tier 1 bis 2

| | Nr. | Getötet nach ? Tag. | Gewicht zu Beginn g | Gewicht zu Ende g | Zahl der eingeatmeten Keime | Kieferwinkeldrüsen: Gland. subment. und submaxill. | Halsdrüsen: Gland. cervical |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Vers. I vom 29. IX. 1921 | 1 (415) | 39 | 260 | ? | ca. 320 000 | — | — |
| | 2 (411) | 27 | 230 | 370 | ca. 320 000 | — | — |
| Versuch II. vom 30. IX. 1921 | 3 (410) | 42 | 220 | 380 | ca. 320 000 | — | — |
| | 4 (414) | 42 | 170 | 310 | ca. 320 000 | — | — |
| | 5 (407) | 125 | 270 | 500 | ca. 320 000 | — | — |
| Versuch II vom 30. IX. 1921 | 6 (412) | 125 | 190 | 680 | ca. 320 000 | — | — |
| | 7 (408) | 42 | 210 | 350 | ca. 320 000 | 2 erbsengroße Drüsen. | Rechts 1, links 2 [illegible] große Drüsen. |
| | 8 (413) | 42 | 160 | 330 | ca. 320 000 | Wie Nr. 7. | Wie Nr. 7. |
| | 9 (406) | 125 | 250 | 470 | ca. 320 000 | — | — |
| | 10 (409) | 125 | 200 | 610 | ca. 320 000 | — | — |



*im Findelschen Inhalationsturm.*

**verrieben 100 mg in 20 ccm Kochsalzlösung. Die Verreibung wird durch einen wird in den unteren Teil des Inhalationsturmes geleitet und aus dessen oberem von 1,8 ccm Quecksilbersäule stehenden Luftstrom werden im oberen Turmteil anderen, im Versuch II paarweise (Nr. 3 mit 5, Nr. 4 mit 6, Nr. 7 mit 9. Weise mit einer Mosettigbattisthaube versehen. Die Meerschweinchen werden durch Nackenschlag, Tier 3 bis 10 durch Chloroform.**

| Lungen- und Bronchialdrüsenbefund | Milz und andere Organe | Diagnose |
|---|---|---|
| — | — | Völlig normaler Befund. Infektion mißlungen. |
| ungen weisen ein fleckiges Aussehen auf, das durch dunkelrote, zum Teil konfluierende, indurierte Herde bedingt ist, welche besonders reichlich an den Rändern und in der rechten Lunge zahlreicher sind als in der linken. In den Herden finden sich deutlich kleinste Knötchen. | Die Milz weist ziemlich reichlich Knötchenbildung auf. An anderen Organen kein Befund. | Keine Hyperplasie der Halsdrüsen. Tuberkulose der Milz. Rote. herdweise Hepatisation der Lungen mit beginnender Knötchenbildung. |
| ungen: Hepatisierte Herde mit reichlicher Knötchenbildung. | — | Isolierte Tuberkulose der Lungen ohne nachweisbare Beteiligung anderer Organe. |
| efund wie Nr. 3. | — | Wie Nr. 3. |
| ungen blutreich. Durch braunrote Indurationen (bis zu Erbsengröße) fleckiges Aussehen. | — | Herdweise rote Hepatisation der Lungen ohne nachweisbare Beteiligung anderer Organe. |
| ur die Spitzen beider Oberlappen sind graurötlich induriert, die der rechten Seite mehr als der linken. Diese Stellen enthalten bis hirsekorngroße Knötchen. | Gravidität mit einem 130 g schweren Foetus. | Tuberkulose beider Lungenspitzen ohne nachweisbare Beteiligung anderer Organe. |
| ereinzelte weißliche, ziemlich scharf konturierte Knötchen besonders an den Rändern. | — | Hyperplasie der Halsdrüsen. Isolierte Tuberkulose der Lungen. |
| ie Nr. 7. | — | Wie Nr. 7. |
| ur die Spitze des rechten Oberlappens ist braunrot induriert, ohne daß makroskopisch Knötchen sichtbar sind. Der linke Unterlappen, der i. A. blutreicher ist als die übrige blaßrosa gefärbte lufthaltige Lunge, hat durch einige bis hirsekorngroße braunrote Herde (ohne Knötchen) ein geflecktes Aussehen. | — | Rote Hepatisation der Spitze des rechten Oberlappens und einiger Stellen des linken Unterlappens. |
| ungen blutreich; durch braunrote Indurationen bis Erbsengröße geflecktes Aussehen. | — | Herdweise rote Hepatisation der Lungen ohne nachweisbare Beteiligung anderer Organe. |

*Tabelle II. Inhalationsversuche im Findelschen*

**Versuchsanordnung wie bei Tabelle I mit Variation der Verdünnungen der Typ. human. Ludwig vom 22. IX. 1921, hiervon 10 mg in 20 ccm Kochsalzlösung einer Verdünnung der Ausgangsverreibung auf die rechte Conjunctiva geträufelt, Hauptversuch entspricht. Die Tiere werden nach den angegebenen Zeiten mit der vorigen Arbeit.**

| Nr. | Getötet nach ? Tagen | Gewicht | | Zahl der eingeatmeten Keime | Kieferwinkeldrüsen: Gland. subment. und submaxill. | Halsdrüsen: Gland. cervical. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | zu Beginn g | zu Ende g | | | |
| 11 (491) | 103 | 410 | 380 | 2500 | — | — |
| 12 (490) | 49 | 300 | 420 | 2500 | — | Beiderseits bohnengroß. |
| 13 (497) | 121 | 350 | 450 | 1250 | — | — |
| 14 (493) | † 35 | 350 | ? sehr stark abgemagert | 1250 | — | — |
| 15 (494) | ? | 340 | ? | 1250 | — | — |
| 16 (496) | 100 | 300 | 500 | 600 | — | — |
| 17 (492) | 121 | 400 | 450 | 13 | — | — |
| 18 (486) | ? | 270 | ? | 12 | Erbsengroß. | Kaffeebohnengroß, auf de linken Seite eine vo Bohnengröße, zum Te verkäst. |



*Inhalationsturm am 5. X. 1921.*

**Ausgangsverreibung und der Inhalationszeiten. Kultur: Glycerinbouillonkultur verrieben. Zum Vergleich erhalten Meerschweinchen 19 bis 22 je 1 Tropfen so daß die aufgeträufelte Bacillenmenge der inhalierten je eines Tieres aus dem Chloroform getötet. Die Kontrolle der 4 letzten Tiere siehe auch Tabelle III † = eingegangen.**

| Lungen- und Bronchialdrüsenbefund | Milz und andere Organe | Diagnose |
|---|---|---|
| Lungen haben reichlich kleinerbsengroße, grauweiße, leicht erhabene Knötchen, die besonders reichlich in den Spitzen und Rändern sind. | Milz: 6:2,5 cm mit stecknadelkopf- bis hirsekorngroßen, grauen, z. T. gelblichenKnötchen durchsetzt. | Keine Hyperplasie der Halsdrüsen. Tuberkul. der Lungen, ebenso der Milz mit Verkäsung. |
| Lungen unregelmäßig durchsetzt mit dunkelroten hepatisierten konfluierenden Herden mit einzelnen Knötchen. | Makroskopisch ohne Befund. | Geringe Hyperplasie der Halsdrüsen. Beginnende Tuberkulose der Lungen. |
| Die i. A. blutreichen Lungen haben vereinzelte leicht erhabene weißliche Knötchen, die am Unterrande des linken Oberlappens in einer Kette dem Lappenrande anliegen und thorakalwärts eine Gruppe von 3—4 Knötchen bilden. 2 ebensolche isolierte Knötchen liegen an der Unterfläche des rechten Oberlappens. | — | Beginnende Tuberkulose der Lungen. |
| Adhäsive Pleuritis im Bereich des linken Oberlappens, wo, wie auch im rechten Unterlappen, indurierte Herde liegen. Außerdem findet sich am Rande des linken Unterlappens ein hirsekorngroßes weißliches Knötchen. | — | Beginnende Tuberkulose der Lungen. Pleuritis adhaesiva. |
| Vollständige Hepatisation beider Oberlappen mit reichlicher Knötchenbildung. Rechter Mittellappen größtenteils, beide Unterlappen stellenweise hepatisiert mit reichlich Knötchenbildung. Bronchialdrüsen hyperplastisch und verkäst. | Milz: 9 : 4 cm mit ausgedehnter Tuberkelbildung, zum Teil im Stadium der Verkäsung. Leber: fettig degeneriert mit starken tuberkulös. Veränderungen. | Ausgedehnte Tuberkulose der Lungen mit Verkäsung der Bronchialdrüsen. Ausgedehnte Tuberkulose der Milz und der Leber. |
| Nur die Oberlappen beider Lungen sind hepatisiert und graurot. Ebensolche Herde befinden sich auch an den Rändern der Unterlappen in der Hilusgegend. In allen diesen Herden submiliare gelblich durchschimmernde Knötchen. | — | Rote Induration der Lungen, besonders der Oberlappen mit vereinzelter Knötchenbildung. |
| Im rechten Ober- und Mittellappen je eine ziemlich ausgedehnte graurote Hepatisation, von denen die des Mittellappens die untere Fläche durchzieht, die des Oberlappens die Spitze ausfüllt. An diesen Stellen ist die Oberfläche eingezogen, hier sind auch hellere runde Knötchen zu erkennen. Eine ebensolche kleinere Hepatisation an der Spitze des linken Oberlappens. | — | Herdweise rote Hepatisation mit Knötchenbildung in den Lungen, besonders an den Spitzen. |
| Ziemlich reichlich Tuberkelknötchen, zum Teil verkäst. | Milz: Sehr groß, von Tuberkelknötchen durchsetzt. | Tuberkulose der Halsdrüsen, der Milz und der Lungen, zum Teil mit Verkäsung. |





*Tabelle II (Fortsetzung). Vergleichende*

| Nr. | Getötet nach ? Tagen | Gewicht zu Beginn g | Gewicht zu Ende g | Zahl der Keime | Kieferwinkeldrüsen: Gland. subment. und submaxill. | Halsdrüsen: Gland. cervical |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 19 (487) | 49 | 430 | 470 | 2500 | O. B., ebenso die Augen. | Rechts ein kirschgroßes Paket aus 2 etwa gleich großen Drüsen. |
| 20 (489) | 76 | 320 | 270 | 2500 | Wie Nr. 19. | Rechts von der Mitte des Halses eine kirschgroße weißgelbliche, nicht verkäste Drüse. |
| 21 (495) | ? | 330 | 530 | 13 | Wie Nr. 19. | — |
| 22 (488) | ? | 300 | 370 | 13 | Wie Nr. 19. | — |

Daß diese in den späteren Stadien der Erkrankung mit im Spiele sein kann, wollen wir nicht in Abrede stellen; aber in der Hauptsache und im Anfange kommt die Verödung des lufthaltigen Parenchyms durch eine interstitielle zellige Wucherung und Verdickung in den Alveolarscheidewänden zustande. Den Wänden größerer Capillaren lagern sich öfter zahlreiche Zellen an. Andere pathologische Befunde, wie z. B. Verstopfung und Thrombosierung von größeren Gefäßen durch Blut und hyaline Massen, seien hier nur kurz erwähnt.

Die Frage, ob diese Herde ihre Entstehung der Ansiedelung von Tuberkelbacillen verdanken, ist zu bejahen. Das beweisen schon jene Fälle, bei denen innerhalb der so veränderten Lungenbezirke Tuberkelknötchen makroskopisch zu erkennen sind. In anderen Fällen sind diese Knötchen aber außerordentlich fein und nur bei mikroskopischer Untersuchung festzustellen. In einem Fall war der ganze, scheinbar hepatisierte Bezirk bereits in Verkäsung übergegangen, und in einem anderen Falle waren größere Bezirke der Lunge durch Blut ausgefüllt und zeigten das Bild eines hämorrhagischen Infarktes. Typische Riesenzellentuberkel, wie sie bei vorgeschrittener Lungentuberkulose aufzutreten pflegen, haben wir allerdings nicht gesehen. Aber die angeführten Tatsachen genügen schon, um den tuberkulösen Charakter dieser Lungenveränderungen zu beweisen.

Was diese mikroskopischen Befunde lehren, ist folgendes: *Der entzündliche Prozeß in den Lungen nimmt seinen Ausgang nicht von dem Innern der Lungenbläschen, auch nicht von der Schleimhaut der*

*Versuche mit conjunctivaler Infektion.*

| Lungen und Bronchialdrüsenbefund | Milz und andere Organe | Diagnose |
|---|---|---|
| ...gen unregelmäßig durchsetzt von dunkelroten ...epatisierten konfluierenden Herden mit einzel...en Knötchen. | Milz groß mit vereinzelten hellen hirsekorngroßen Knötchen. | Tuberkulose der Halsdrüsen, der Milz und der Lungen. |
| ...chte Oberlappen zum größten Teil, linke Oberlappen fast ganz hepatisiert mit ziemlich reich...chen grauweißen Knötchen. Ebensolche Knötchen auch auf der Oberfläche der sonst lufthaltigen Lunge. | Milz sehr groß mit zahlreichen Tuberkelknötchen. Leber ebenso. | Tuberkulose der Halsdrüsen, der Lungen, und Leber. |
| ...n der Vorderfläche des linken Unterlappens 2 stecknadelkopfgroße, graue, leicht erhabene Knötchen. Auf der medialen Fläche des rechten Unterlappens eine Gruppe von 3 ebensolchen Knötchen. Oberlappen völlig frei. | — | Sehr geringe Knötchenbildung in den Lungen. |
| ...ur an der Zwerchfellfläche des rechten Unterlappens 3 Knötchen von demselben Aussehen wie bei Tier 21. | — | Wie Nr. 21. |

*kleineren oder größeren Bronchien;* wohl sind diese in den veränderten Bezirken zuweilen krankhaft verändert, ihr Lumen erscheint zuweilen komprimiert, es hat eine Desquamation des Epithels stattgefunden, aber von der Bildung primärer Tuberkelknötchen auf der Schleimhaut ist nichts zu sehen. So weit man aus den mikroskopischen Bildern Schlüsse ziehen darf, scheint die Wucherung der zelligen Elemente der Alveolarsepten von den durchziehenden Capillaren auszugehen. Vielleicht ist die dauernde Blutfülle schon ein genügender Reiz, der die Capillarwände zur Wucherung in die Lungenbläschen reizt, wahrscheinlicher ist aber, daß dieser Reiz von einzelnen Tuberkelbacillen ausgeht, die bei der Einschwemmung in den Blutkreislauf von den Endothelien der Lungencapillaren adsorbiert und abgefangen worden sind. Eingehendere mikroskopische Untersuchungen müssen hier Klarheit schaffen.

Diese eigenartigen Lungenveränderungen der Inhalationstiere tragen einen *chronischen Charakter*. Sie machen durchaus den Eindruck eines langsam verlaufenden, indurierenden Prozesses; von einer Verkäsung ist nur selten etwas zu sehen. Auch die zeitliche Dauer der Krankheit zeugt für die lange Dauer dieser Lungenveränderungen; denn die Tiere leben durchweg recht lange. Wenn wir auch den spontanen Tod der Tiere nicht abgewartet haben, so beweist doch der sehr geringe pathologische Lungenbefund bei solchen Tieren, die bis zu vier Monaten gelebt haben, daß es sich um einen langhinziehenden Krankheitsprozeß handelt. Dieser, vor allem bei den Inhalationstieren

beobachtete Lungenbefund verdient besonders hervorgehoben zu werden. *Findel* macht in seiner Arbeit auf ähnliche Befunde nicht aufmerksam, sondern begnügt sich damit, nur die Knötchenbildung in der Lunge seiner Inhalationstiere mitzuteilen. Die Beschränkung der tuberkulösen Veränderungen auf einzelne Lungenbezirke, sowie der chronische Verlauf der Erkrankung scheinen uns jedoch recht beachtenswerte Eigentümlichkeiten der Inhalationstuberkulose des Meerschweinchens zu sein, ein pathologisch-anatomischer Befund, dem man differentialdiagnostische Bedeutung gegenüber einer auf anderem Wege erzeugten Lungentuberkulose beimessen könnte.

Wie bereits erwähnt, bestand in vier Fällen gleichzeitig eine Halslymphdrüsentuberkulose, bei einem Tiere eine gleichzeitige Erkrankung von Lunge und Milz und Leber und bei drei Tieren eine solche der Milz. Das Bestehen von anderen Organerkrankungen neben der Lungentuberkulose, die gleichzeitige Erkrankung von Milz und Leber bei Meerschweinchen, die Tuberkelbacillen eingeatmet haben, ist eine Beobachtung, die nicht nur von uns gemacht worden ist. Derartige Befunde finden sich auch in anderen einschlägigen Arbeiten, z. B. auch in der *Findels*.

Von 61 — in seinen Tabellen aufgeführten — Versuchsmeerschweinchen notiert *Findel* bei 30 (= ca. 49,1%) Abweichungen vom normalen Halsdrüsenbefund. Nur bei sieben von diesen Tieren (= 11,45% der Gesamtzahl) hält er diese Veränderungen für spezifisch tuberkulöse. Dem Befunde der übrigen Tiere mißt er keine Bedeutung bei, da erstens Tuberkelbacillen in den Drüsen mikroskopisch nicht nachweisbar waren, und *Findel* nur dann eine Infektion des Tieres als vorhanden ansieht, wenn die Bacillen fortschreitende pathologische Veränderungen im Körper hervorrufen. Wir sind überzeugt, daß *Findel* ein Fortschreiten und eine Weiterentwicklung der Veränderungen auch noch bei einem weiteren Teile der Versuchstiere hätte feststellen können, wenn er diese ebenso lange wie die 7 Tiere mit dem positiven Befund am Leben gelassen hätte. Auffallenderweise nämlich erfolgte bei ihnen die Sektion erst frühestens 40 bis spätestens 85 Tage nach dem Inhalationsversuch, während im Durchschnitt bei den anderen Tieren nach 26 Tagen die Autopsie vorgenommen wurde.

Die Bedeutung dieser von *Findel* beschriebenen Befunde liegt für uns aber vor allem darin, daß damit bewiesen ist, *daß bei einem Teile der Inhalationstiere mit Sicherheit eine Infektion der Halsdrüsen stattgefunden hat, die sich nur durch eine Resorption von Tuberkelbacillen von den Schleimhäuten des obersten Teiles des Respirationstraktus erklären läßt. Wenigstens bei diesen Tieren ist es also nicht notwendig, sich die Tuberkelbacillen vom Einatmungsstrom bis in die Alveolen fortgetragen zu denken, um die Entstehung der Lungentuberkulose zu erklären.*

Dem pathologisch-anatomischen Bilde der Inhalationstuberkulose des Meerschweinchens wäre das nach oraler Infektion (oder conjunctivaler) erhaltene gegenüberzustellen. Wir können uns hier kurz fassen



und wegen der Einzelheiten auf unsere vorhergehende gemeinsame Arbeit hinweisen. Als wesentlichsten Unterschied heben wir hervor, daß bei der oralen Infektion fast regelmäßig eine tuberkulöse Erkrankung der Halslymphdrüsen im Vordergrunde stand. *Die meist hochgradige Halslymphdrüsentuberkulose bei der oralen Infektion, das Fehlen der Drüsenveränderungen bei den meisten Tieren, die der Inhalation von Tuberkelbacillen ausgesetzt waren, ist sehr charakteristisch.* In Anbetracht dieses verschiedenen pathologischen Befundes könnte man die Frage bereits für entschieden halten, daß die Lungentuberkulose der Inhalationstiere in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle nur durch Einatmung in die Lungenalveolen, die der oral infizierten Tiere dagegen ausschließlich durch Resorption von den Lymphbahnen der Mund- und Rachenhöhle, also auf lymphohämatogenem Wege aus entstanden sein müsse. Gegen eine derartige, sich bei einem ersten Vergleich aufdrängende Schlußfolgerung, erheben sich aber große Bedenken.

In der vorhergehenden Arbeit hatten wir gezeigt, daß nach der Infektion des Augenbindehautsackes von Meerschweinchen und Kaninchen gewöhnlich eine Halslymphdrüsentuberkulose entsteht, die bei den Meerschweinchen in der Form starker tuberkulöser Drüsentumoren, bei Kaninchen in weniger hochgradiger Form in die Erscheinung tritt. Dabei konnten wir die interessante Beobachtung machen, daß bei der Infektion der Conjunctiva die Vergrößerung der Drüsen und die Entwicklung tuberkulöser Tumoren ausblieb, *wenn die Infektionsdosis sehr klein gewählt wurde.* Daraus mußten wir den Schluß ziehen, daß diese wenigen Bacillen die Schleimhaut, ohne dort makroskopische Veränderungen zu hinterlassen, durchdringen, die entsprechenden Lymphbahnen und Drüsen passieren können, ohne dort seßhaft zu werden und ohne dort pathologische Prozesse zu erzeugen. Diese Ansicht steht mit den wichtigen Befunden *Weichselbaums* und *Bartels* im vollen Einklange, die auf das „lymphoide Stadium“ der tuberkulösen Drüsenvergrößerung hingewiesen haben, in welchem die Drüsen makroskopisch nicht verändert zu sein brauchen, während histologisch spezifische tuberkulöse Prozesse nachweisbar sein können.

Die mit sehr geringen Mengen von Tuberkelbacillen conjunctival erfolgte Infektion der Meerschweinchen und Kaninchen war nun keineswegs spurlos an den Tieren vorübergegangen, vielmehr hatte sie in der Lunge, und zwar bei den Meerschweinchen ausschließlich in der Lunge festen Fuß gefaßt. Es verdient außerdem noch besonders hervorgehoben zu werden, daß der makro- und mikroskopische Lungenbefund der Meerschweinchen derselbe wie der der Inhalationstiere war. Es fanden sich spärliche miliare Tuberkel, größere und kleinere dunkelrote, anscheinend hepatisierte Bezirke, die sich hauptsächlich



an den Lungenzipfeln und freien Rändern befanden. *Das gleiche pathologisch-anatomische Bild einer auf die Lungen beschränkten Tuberkulose kann also durch eine Infektion mit sehr geringen Dosen, gleichgültig ob diese inhaliert oder auf die Augenbindehaut geträufelt wurden, erzeugt werden.*

Auch für die subcutane Infektion mit Tuberkelbacillen ist durch vielfache neue Beobachtungen erwiesen, daß das sog. *Cornet*sche Gesetz (Lokalisation zuerst in den zugehörigen Lymphdrüsen) nicht gilt, wenn die Infektion in sehr kleinen Mengen erfolgt, also gerade in solchen Fällen, wie sie in der Praxis sehr häufig sind. Hingewiesen sei hier noch einmal auf die pathologisch-anatomischen Veränderungen des Kaninchens nach conjunctivaler Infektion. Charakteristisch ist die außerordentlich starke Erkrankung der Lungen, die von kleineren und größeren käsigen Herden durchsetzt sind. Es ist erstaunlich, daß Tiere mit derartig fortgeschrittener Lungentuberkulose so lange ihr Dasein fristen können. Gegen diese Veränderungen fallen die wenigen, meist stecknadelknopfgroßen Knötchen der Nieren, die sich zuweilen bei den Tieren vorfinden, wenig ins Gewicht. Das ganze Bild wird beherrscht durch die ausgebreitete Lungentuberkulose. Jeder, der ein solches Bild zum ersten Male sieht, ohne die Vorgeschichte der Infektion zu kennen, wird annehmen, daß hier eine primäre Lungentuberkulose vorliegt, einmal deswegen, weil die Lunge von den inneren Organen fast allein erkrankt ist, und zweitens weil in den Lungen die vorgeschrittensten und ältesten Krankheitsherde zu sein scheinen. Das Bild ist ein derartiges, daß es wohl durch eine Inhalation von Tuberkelbacillen erzeugt sein könnte, weil die ganze Lunge meist gleichmäßig von Knoten und Knötchen durchsetzt ist. *In Wirklichkeit handelt es sich aber um eine sekundäre Lungenerkrankung, bei der eine aerogene Infektion ausgeschlossen ist.* Sie kann nur auf lympho-hämatogenem Wege entstanden sein. Eintrittspforte der Tuberkelbacillen in den Kaninchenorganismus war die Schleimhaut des Augenbindehautsackes.

Daß das Bild der Lungentuberkulose, wie es bei den Inhalationstieren beobachtet wird, auch auf anderem Wege und bei einer anderen Eintrittspforte der Bacillen erzeugt werden kann, sofern nur die infizierende Dosis z. B. bei einer Augenbindehautinfektion sehr klein gewählt wird, ist an und für sich eine sehr bemerkenswerte Feststellung. Nach unseren Untersuchungen betrug dabei die geringste Dosis 13 Keime. Sie entspricht also fast der gleichen Menge, mit der *Findel* und wir eine Inhalationstuberkulose erzeugen konnten.

Es sei hier nochmals auf die zwei letzten Tierversuche (Tier 21 und 22) der Tab. II aufmerksam gemacht, die diese Tatsache in überzeugender Weise dartut. Gegenüber den Inhalationstieren erhielten



die Meerschweinchen je einen Tropfen einer Verdünnung der Ausgangsverreibung auf die rechte Conjunctiva geträufelt. Die aufgeträufelte Bacillenmenge entsprach der inhalierten je eines Tieres aus dem Hauptversuch; mit anderen Worten: Eine Verdünnung mit 13 Tuberkelbacillen, auf die Conjunctiva gebracht, erzeugte dasselbe Bild einer isolierten Lungentuberkulose, wie dieselbe Zahl von Keimen, die inhaliert wurden.

Da nun die Lungentuberkulose nach conjunctivaler Infektion auf keinem anderen Wege als auf dem *lympho-hämatogenen* zustande gekommen sein kann, so drängt sich mit zwingender Folgerichtigkeit der Gedanke auf, ob nicht auch die Lungentuberkulose der Inhalationstiere sich auf demselben Wege entwickelt hat.

Bevor wir diese Frage beantworten, ist es notwendig, sich über die physikalischen Verhältnisse bei der Einatmung einer künstlich versprayten Tuberkelbacillenkultur Rechenschaft zu geben. Daran ist wohl nicht zu zweifeln, daß die Versuchstiere die mit Bacillen beladenen Tröpfchen durch die Nasenatmung aufnehmen. Etwa zwei Drittel der gesamten inhalierten Bacillen bleiben nach der auch von *Findel* vertretenen Annahme auf der Nasenschleimhaut liegen, während etwa ein Drittel in die Lungen eingeatmet werden soll.

Daß es sich wirklich so verhält, hat *Hara* gezeigt. Er wollte feststellen, ob feine corpusculäre, nicht organisierte Elemente, in Wasser suspendiert, als Tröpfchen bis in die tieferen Teile der Atmungswege des Meerschweinchens direkt (aero-pulmogen) gelangen können. Als geeignet für solche Experimente erwies sich das von *P. v. Baumgarten* empfohlene Pigmentpulver „Echt rot m. L.", ein Pulver, das aus feinen, intensiv roten Pigmentkörnchen besteht, die in Wasser unlöslich sind.

Das Ergebnis der Versuche war folgendes: Von den mit dem Buchner-Spray verstäubten Farbteilchen blieben die meisten an der Nasen- und Mundschleimhaut der Inhalationstiere hängen. Im Rachen und Kehlkopf waren schon viel weniger nachweisbar, in der Luftröhre und in den großen Bronchien nur Spuren, eine Spur nur im Lungenrest bei solchen Tieren, die sehr viel Farbstoff aufgenommen hatten, in den Lungenzipfeln nur einmal eine Spur. In diesem Falle hatte die Verstäubung dicht an der Nasenhöhle des Tieres eine halbe Stunde lang stattgefunden.

Die Schlußfolgerung aus diesen Versuchen zieht *Hara* mit folgenden Worten[1]):

„Man sieht also, daß auch unter relativ günstigsten Bedingungen (15—30 Minuten lange Verstäubung einer sehr reich mit Pigmentkörnchen versehenen Aufschwemmung und ganz geringer Entfernung des Versuchstieres von der Sprayöffnung) nur ein verschwindend mini-

[1]) *P. v. Baumgarten*, Arb. a. d. Geb. d. pathol. Anat. u. Bakt. 7, 465. 1911.



maler Teil der mit Hilfe eines fein konstruierten Sprayapparates verspritzten corpusculären, nicht organisierten Elemente durch Einatmung bis über den Kehlkopf der Versuchstiere gelangt; aber selbst in diesen günstigsten Fällen dringen sie nicht immer in durch die angewandte minutiöse Untersuchungsmethode nachweisbarer Menge bis in die Lungenalveolen ein, sondern in den meisten Fällen nur in die großen Bronchien, bis zu deren Eintrittsstelle in die Lunge. Wenn aber die Entfernung der Versuchstiere von der Sprayöffnung größer und die Verstäubungsdauer kürzer wird, dann nimmt die Aufnahme von Farbstoffkörnchen durch die Inspiration in die tieferen Teile des Respirationstraktus sehr rasch ab und sinkt bald auf Null. Dagegen lassen sich inhalierte Pigmentkörnchen bis zuletzt bei der angewandten Versuchsanordnung an der Oberfläche von Nase-, Mund- und Rachenschleimhäuten nachweisen."

Es steht also fest, daß die Hauptmenge, etwa zwei Drittel der Pigmentkörnchen auf der Oberfläche der Nasen-, Mund- und Rachenschleimhaut haftenbleiben. Dasselbe trifft auch für versprayte Tuberkelbacillen zu, welche die Versuchstiere eingeatmet haben. Sind wir nun berechtigt, diese auf der Schleimhaut des oberen Respirationstraktus haftenden zahlreichen Bacillen für die Entwicklung eines tuberkulösen Prozesses im Meerschweinchenorganismus als weniger erheblich hinzustellen, dagegen den in die Lungenalveolen gelangten spärlichen Bacillen die Hauptrolle zuzuerkennen?

Auch wenn wir annehmen, daß ein Teil der auf der vorderen Nasenschleimhaut liegengebliebenen Tuberkelbacillen auf physiologischem Wege wieder nach außen befördert wird, jener Teil, der auf der hinteren Nasenschleimhaut haftengeblieben ist, wird entweder sofort von den Lymphbahnen — ob dies direkt oder indirekt durch Leukocyten geschieht, mag dahingestellt bleiben — an Ort und Stelle aufgenommen oder er kommt in Kontakt mit den Schleimhäuten der Rachenwand, deren Lymphgefäße sich ebenfalls an der Aufnahme von Bacillen beteiligen.

Der weitere Weg, den die in die Lymphgefäße der Nasen-, Mund- und Rachenschleimhaut gelangten Bacillen einschlagen, ist klar vorgezeichnet und von uns eingehend geschildert worden. Wenn auch die Quellgebiete der Lymphbahnen des oberen Respirations- und Verdauungstraktus verschieden sind, die Abflußwege sind dieselben. Wie unsere Untersuchungen über die Entstehung der Halsdrüsentuberkulose und diejenigen *Mosts* über die der Lungentuberkulose gezeigt haben, durchfließt der vom Kopf stammende Lymphstrom die Mental-, Submaxillar-, vor allem aber die tiefen Halslymphdrüsen: aus diesen erfolgt dann die Weiterleitung durch den Truncus cervicalis in die obere Hohlvene und von da in das rechte Herz und die Arteria pulmonalis zur Lunge.



Daß die auf dem Wege der Inhalation auf die Nasenschleimhaut der Versuchstiere gelangten Bacillen in der Tat diesen Weg nehmen, das beweisen zunächst jene Tiere, bei denen tuberkulöse Lymphdrüsenveränderungen oder eine allgemeine Infektion vorhanden waren. Wir hatten unter unseren 18 Fällen sechs Tiere, *Findel* gibt bei 30 (= 49,1%) Abweichungen vom normalen Halsdrüsenbefund an. Allerdings spricht er diese Veränderungen nur bei 7 (= 11,45 %) Tieren der Gesamtzahl für spezifisch tuberkulös an. Angesichts dieser Tatsachen könnten die Anhänger der Inhalationstheorie vielleicht also argumentieren: Gerade der Umstand, daß nur ein geringer Teil der Inhalationstiere eine Halsdrüsentuberkulose zeigt, während der größere Teil davon verschont bleibt, beweist, daß die Bacillen nicht über den lymphohämatogenen Weg, sondern direkt in die Lungen gekommen sind. Wir sehen doch bei der oralen Infektion fast regelmäßig eine Halsdrüsentuberkulose entstehen, bei den meisten Inhalationstieren dagegen nicht.

Dieser Einwand ist nicht stichhaltig. Es muß nachdrücklich betont werden, daß beide Infektionsmechanismen, die orale Infektion und die Inhalation durchaus voneinander verschieden sind. *Hara* ist derselben Ansicht, daß die durch künstliche Sprayapparate verstäubten Bacillen in bezug auf die Resorption und Infektion von den Rachenwegen aus durchaus in keiner Weise gleichzusetzen ist den durch Verfütterung eingeführten Bacillen. Die durch den Sprayapparat verstäubten befinden sich in äußerst feiner Verteilung, besonders wenn es nur wenige Bacillen sind; sie kommen in einen viel innigeren Kontakt und in gleichmäßigerer Verteilung auf die Nasen- und Rachenschleimhaut, als die mit Kochsalzlösung verriebenen Tuberkelbacillen, die bei noch so exakter Verreibung immer noch Bacillenkonglomerate bilden. Die durch den Spraynebel auf die Nasenschleimhaut abgelagerten wenigen Bacillen werden von den entsprechenden Lymphbahnen entweder direkt aufgenommen oder durch Leukocyten in die Lymphgefäße transportiert. Die wenigen Exemplare passieren dann die Lymphwege mit ihren zugehörigen Drüsen, ohne in ihnen seßhaft zu werden und ohne makroskopische tuberkulöse Drüsentumoren zu bilden, gelangen dann durch den Truncus cervicalis ins Blut, ins rechte Herz und so in die Lungen, genau in derselben Weise, wie die wenigen Bacillen, die bei conjunctivaler Infektion, ohne Drüsenveränderungen zu machen, in die Lunge gelangen.

*Das entscheidende Moment bei der Inhalation ist also der Infektionsmechanismus, die äußerst feine und gleichmäßige Verteilung der Bacillen auf der Schleimhaut des obersten Teiles des Respirationstraktus.*

Der andere, nach Ansicht der Vertreter der Inhalationstheorie entscheidende Beweis, die Tatsache, daß die eingeatmeten Tuberkel-





bacillen schon sehr kurze Zeit nach der Inhalation in der Lunge der Versuchstiere nachweisbar sind, ist ebenfalls nicht stichhaltig; sie läßt sich auch auf andere Weise erklären.

Es ist eine bekannte Tatsache, daß die Aufnahme und der Transport der Bacillen auf dem Lymphwege mit großer Schnelligkeit vor sich gehen kann. Wir verweisen hier auf die Versuche *Jos. Kochs* und *Möllers*[1]) über die Resorption von Tuberkelbacillen durch die gesunde Darmschleimhaut. In den Versuchen konnte nachgewiesen werden, daß die Aufnahme einer Bacillenemulsion sofort nach der Einspritzung in den Dünndarm durch die Chylusgefäße erfolgt. Nach $1^1/_4$ Stunden waren die Bacillen bereits im Blut und den inneren Organen, darunter auch in den Lungen nachweisbar. Wir verweisen ferner auf die Versuche *Jos. Kochs*[2]) über die intraperitoneale Infektion, bei der die Aufnahme von Tuberkelbacillen in den lymphoiden Apparat des großen Netzes unmittelbar nach der Einspritzung beginnt und bereits nach Verlauf von 10—15 Minuten zu einem erheblichen Teile beendet ist. Das Erscheinen der Bacillen im Blut nach vorausgegangener Infektion von Schleimhäuten kann also nur eine kurze Zeit von wenigen Minuten erfordern. So ist auch dieser nach den Feststellungen *B. Heymanns* u. a. gelungene Nachweis durchaus kein sicherer Beweis, daß die nach einem Inhalationsversuch im Lungengewebe nachweisbaren Tuberkelbacillen nur auf dem Wege der Einatmung dahingelangt sein können.

Fassen wir die *Hauptergebnisse* unserer Ausführungen zusammen, so hat die Nachprüfung der *Findel*schen Versuche mit der gleichen, von ihm angegebenen Technik, eine Bestätigung seiner Angaben ergeben, daß Meerschweinchen durch Inhalation eine isolierte Lungentuberkulose erwerben können. Das war bei der Mehrzahl, bei 67 % der Tiere der Fall, während andere neben der Lungentuberkulose gleichzeitig eine Halsdrüsentuberkulose aufwiesen. Die Inhalation kann aber auch eine tuberkulöse Allgemeininfektion des Meerschweinchens zur Folge haben.

Bei der oralen und conjunctivalen Infektion mit mittleren Dosen (in unseren Versuchen mit durchschnittlichen Mengen von $^1/_4$—$^1/_{40}$ mg) entsteht bei der Mehrzahl der Meerschweinchen und Kaninchen eine typische Halsdrüsen-, sowie eine sekundäre Lungen- und Milztuberkulose.

Bei der Infektion des Augenbindehautsackes mit sehr geringen Dosen (8700—13 Bacillen) kann sich ebenfalls eine isolierte Lungen-

[1]) Veröffentl. d. Robert-Koch-Stiftung. Bd. II, Heft 3 und Dtsch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 33.

[2]) Bericht über die 8. Tagung der Freien Vereinig. f. Mikrobiologie vom 8. bis 10. IX. 1920 in Jena. Zentralbl. f. Bakteriol., Parasitenk. u. Infektionskrankh., Abt. I, Orig. 85, Beiheft. 1921.




tuberkulose entwickeln, die makroskopisch und mikroskopisch dasselbe Bild, wie das einer Inhalationstuberkulose zeigt. Eine manifeste Halsdrüsentuberkulose kann dabei ausbleiben.

Wie wir in der vorhergehenden Arbeit gezeigt haben, werden bei der oralen und conjunctivalen Schleimhautinfektion die Tuberkelbacillen von den entsprechenden Lymphbahnen aufgenommen; sie setzen sich in den Submental-, Submaxillar- und den tiefen Halslymphdrüsen fest und erzeugen eine typische Lymphadenitis. Sehr geringe Mengen von Tuberkelbacillen können aber auch die wenigen Drüsenfilter durchbrechen, um im kurzen Lauf ins rechte Herz und in die Arteria pulmonalis zu gelangen. Die Infektion der Lungen und anderer innerer Organe erfolgt also auf dem lympho-hämatogenen Wege.

Es ist nicht einzusehen, weshalb Tuberkelbacillen, die durch die Inhalation auf die Schleimhaut des oberen Respirationstraktus geraten sind, nicht denselben natürlichen und physiologischen Weg über die entsprechenden Lymphbahnen einschlagen sollen, wie die der oralen und conjunctivalen Infektion. Daß bei der Inhalation in der Tat eine Resorption durch Lymphbahnen stattfindet, das zeigen jene Inhalationstiere, bei denen neben der Lungentuberkulose auch gleichzeitig eine Halsdrüsentuberkulose entstanden war.

Die Möglichkeit, daß beim Einatmen eines mit der *Findel*schen Technik erzeugten, dichten Bacillennebels Bacillen in die Lunge der Versuchstiere geraten können, kann auf Grund physikalisch-theoretischer Erwägung und Versuche nicht in Abrede gestellt werden; aber in der Regel werden die bacillenhaltigen Tröpfchen zunächst von den Lymphbahnen der Schleimhaut der oberen Atmungswege, der Nase und des Rachens, aufgenommen und auf diesem Wege dem Blute zugeführt.

Wenn zu einer erfolgreichen Fütterungsinfektion größere Bacillenmengen notwendig sind als bei der Inhalation, so ist der Grund hierfür nicht in quantitativen Verhältnissen der infizierenden Dosis, sondern in dem verschiedenen Mechanismus beider Infektionsarten zu suchen. Während bei der Fütterung die Bacillen meist schnell heruntergeschluckt werden, die Möglichkeit der Resorption der Lymphbahnen nur eine geringe oder gar nicht vorhanden ist, so schlägt sich bei der Inhalation der feine bacillenhaltige Nebel in gleichmäßiger Weise auf der Schleimhaut des oberen Respirationstraktus nieder und bleibt längere Zeit im innigen Kontakt mit einer großen Resorptionsfläche. Selbst äußerst geringe Mengen haben so die beste Möglichkeit, direkt (oder indirekt durch Leukocyten) von den Lymphbahnen aufgenommen und nach Passieren der Drüsenfilter dem Blute zugeführt zu werden.

*Die Inhalationstuberkulose des Meerschweinchens ist das Endergebnis einer Kontaktinfektion auf der breiten Fläche der Schleimhäute der*





*oberen Atmungswege, eine Ansicht, die bereits eine Anzahl von Autoren ausgesprochen hat, und der wir durch unsere Untersuchungen über die Beziehungen der tuberkulösen Infektion zu den Lymphwegen des Kopfes und Halses des Meerschweinchens und des Kaninchens eine neue Stütze gegeben haben.*

Unberührt von dieser Auffassung bleibt die praktische Bedeutung der Tröpfcheninfektion für die Bekämpfung der Tuberkulose. Es ist ein bleibendes Verdienst *Flügges* und seiner Mitarbeiter, uns mit diesem wichtigen Infektionsmodus bekannt gemacht zu haben; es wird auch nicht durch die Tatsache geschmälert, daß inhalierte Tuberkelbacillen auf dem lympho-hämatogenem Wege in die Lunge gelangen können.





# Bemerkungen zu den vorstehenden Arbeiten von Jos. Koch und Baumgarten über Entstehung der Lungentuberkulose durch orale Infektion und Inhalation.

Von
**C. Flügge**, Berlin.

*Jos. Koch* und *Baumgarten* behaupten in den vorstehenden Arbeiten, ich und meine Mitarbeiter hätten die Aufnahme der in Hustentröpfchen verstreuten Tuberkelbacillen von der Mund- und Rachenschleimhaut aus zu wenig berücksichtigt.

Diese Behauptung kann jedoch kaum aufrechterhalten werden. — In meiner Arbeit in Bd. 38 dieser „Zeitschrift" heißt es z. B.: „Bei der später eintretenden Infektion ist immer die Möglichkeit offen, daß dieselbe auf den Lymphbahnen von Nase und Rachen aus erfolgt ist", und in dem meinem zusammenfassenden Buche (1908) angehängten „Rückblick" zähle ich S. 813 die verschiedenen Infektionsquellen auf und sage bei der Inhalation von tuberkelbacillenhaltigen Hustentröpfchen wörtlich folgendes:

„Derjenige Teil (der Tröpfchen), der in Mund und Rachen sich absetzt, kann bei vorliegenden Epithelschädigungen in die Tonsillen oder andere Rachenadnexa eindringen und Halsdrüsentuberkulose veranlassen."

„Sehr häufig wird es zu kombinierter Wirkung mehrerer Infektionsquellen kommen. Ein und derselbe Kranke liefert Gelegenheit zur Inhalation von Tröpfchen und Staub, aber gleichzeitig Gelegenheit zu Kontakten, so daß z. B. für die Rachenadnexa ein Anteil der Tröpfchen, ein Anteil der Stäubchen und ein Anteil des durch Kontakte in den Mund gebrachten Sputums in Betracht kommt."

„Ist die Tröpfchenverstreuung erheblich, so wird diese die Ausbreitung beherrschen und zu Tode führen, ehe die anderen Infektionen stärker entwickelt sind. Ist aber die Tröpfcheninfektion gering, so kommt es vorzugsweise zur Halsdrüsentuberkulose."

Auch bei unseren Tierversuchen haben wir stets auf die Halsdrüsenaffektionen geachtet und diese auf die Aufnahme von Tuberkeln von der Mund- und Nasenschleimhaut bezogen. In *Findels* Protokollen findet sich in zahlreichen Fällen die Angabe, daß die Halsdrüsen geschwollen oder verkäst waren; in den übrigen Fällen war die Infektion durch

Inhalation zu rasch vorgeschritten, als daß merkliche Halsdrüsentuberkulose beim Tode des Tieres sich hätte zeigen können. *Reichenbach* (diese Zeitschr. 60. 1908) hat sogar in einer besonderen Versuchsreihe die Infektion vom Nasenrachenraum geprüft. Er hat zunächst den Nasenraum abzusperren versucht; und als er damit keine Änderung der Infektion erzielte, hat er, um das Verhalten der regionären Lymphdrüsen bei direkter Infektion der Mund- und Rachenschleimhaut zu studieren, Tieren 1000 bis 10000 Bacillen in die Mundschleimhaut injiziert. Der Sektionsbefund war hier ganz anders; stets waren die Halsdrüsen geschwollen, die Milz von tuberkulösen Knoten durchsetzt, dagegen die Bronchialdrüsen normal; ein Befund, der gegen eine Infektion der Lungen auf dem Lymphwege spricht. Leider wurde die Versuchsreihe durch eine Stallseuche gestört und konnte deshalb nicht fortgesetzt werden.

Von anderen Beobachtern seien nur *Kossel, Weber* und *Heuss* erwähnt, die 1905 einen Bericht über ihre an Rindern angestellten Versuche veröffentlichten, in dem sie (S. 36) schreiben: „Für die Frage nach den Inhalationswegen bei der menschlichen Tuberkulose scheint uns der Nachweis von Bedeutung, daß *eine Infektion der am Halse gelegenen Drüsen durch eingeatmete Bacillen erfolgen kann* . . . Daher erscheint es nicht gerechtfertigt, wie es häufig geschieht, für die Infektion der Halsdrüsen ausschließlich die Aufnahme von Bacillen mit der Nahrung verantwortlich zu machen."

Auch hier wird also hervorgehoben, daß neben der direkten Lungeninfektion ein Teil der inhalierten Tröpfchen in die Lymphbahnen des Halses vorgedrungen ist. Aber diese Infektion konnte nicht bedeutungsvoll werden, weil die in die *Lunge direkt* eingeatmeten Tröpfchen eine *viel rascher* vorschreitende Erkrankung bewirkten.

Wir sowohl, wie andere Beobachter haben demnach die Aufnahme von tuberkelbacillenhaltigen Tröpfchen von der Mund- und Rachenschleimhaut aus und ihren Transport durch die Lymphbahnen doch wohl hinreichend gewürdigt.

*Zweitens* wenden sich die Herren *Koch* und *Baumgarten* gegen diejenigen Versuche, die den Beweis liefern sollten, daß die inhalierten Tröpfchen zu einem Teil direkt in die Lunge vordringen und hier tuberkulöse Herde veranlassen. *Jos. Koch* und *Baumgarten* heben hier das Verdienst der pathologischen Anatomen hervor, welche „die pathologisch-anatomischen Befunde der einer Inhalation eines fein versprayten bacillenhaltigen Nebels ausgesetzten Versuchstiere genauer festgestellt und gewürdigt haben." Sie schließen eine Besprechung der alten, vor Jahren so viel erörterten Streitfrage an, ob die Tröpfchen wirklich direkt *in die Lunge* zu gelangen und hier sich anzusiedeln vermögen, oder ob sie vom Verdauungstraktus aus auf Lymphbahnen oder durch das Blut an Stellen der Lungen gelangen, um sich hier festzusetzen.



*v. Behring*, *Calmette*, *Weichselbaum* u. a. traten bekanntlich für letzteren Infektionsmodus ein, *R. Koch*, *Cornet*, *Kolle* u. *Laffert*, *Pfeiffer* u. *Friedberger*, *Kuss* u. *Lobstein*, *Heller* u. *Wolkenstein* usw. und meine Mitarbeiter für ersteren Infektionsweg. Die Frage schien endlich vor einer Reihe von Jahren zu unseren Gunsten entschieden zu sein. *Jos. Koch* und *Baumgarten* zitieren aber aufs neue lediglich Namen, die zur Gegenpartei gehören, wie *Weichselbaum*, *Bartel* und *Spieler*, *v. Baumgarten*, *Hara* u. a., und von den Verhandlungen des Wiener Kongresses, wo ich mich mit *Calmette* und *Weichselbaum* über die Infektionswege auseinanderzusetzen hatte, reproduzieren sie *nur* die Zusammenfassung *Weichselbaums*, während doch wohl jeder unbefangene Besucher jenes Kongresses den Eindruck von den Verhandlungen hatte, daß die gegen die *Calmette-v. Behring*sche Auffassung von mir vorgebrachten Gründe durchschlagend waren.

Zu dieser Streitfrage möchte ich übrigens zunächst hervorheben, daß ich *Hygieniker* und nicht pathologischer Anatom bin, und daß es mir als *Hygieniker* eigentlich ziemlich gleich sein könnte, ob die inhalierten Hustentröpfchen direkt in die Lungen kommen oder im Innern des Körpers einen Umweg über Mundhöhle, Darm- und Halsdrüsen machen müssen. — Ebenso habe ich z. B. in einer in dieser Zeitschrift 1901 erschienenen Arbeit ausdrücklich erklärt, daß auch die von *Ribbert* aufgeworfene Frage, ob nicht die in die Lunge gelangten Keime diese zunächst einfach passieren, und auf hämatogenem Wege die Erkrankung erzeugen, *hygienische* Maßregeln gar nicht berühren.

Aber dadurch, daß *v. Behring* und *Calmette* den Weg durch den Verdauungstraktus so übertrieben und einseitig hervorhoben, traten andere Infektionsquellen mit der Tröpfcheninhalation in lebhafteren Wettbewerb, namentlich Nahrungsmittel, vor allem die Milch, und die Tröpfcheninfektion wurde dadurch in unbegründeter Weise zurückgedrängt. Ferner bleibt, wenn man den Transport der eingeatmeten Tröpfchen bis in die Bronchien ablehnt, zwar ein Rest von Infektionsgefahr durch die Tröpfchen bestehen, aber die eigentümliche Überlegenheit der Tröpfcheninfektion kommt nicht zum Vorschein, denn bei der relativ *geringen Zahl* von Tuberkelbacillen, die gewöhnlich mit den Tröpfchen eingeatmet werden, sind die Chancen, daß dieser Rest von Bacillen von dem Verdauungswege aus infizieren kann, nur sehr gering, wenn nicht etwa neuerdings erwiesen wird, daß auch auf diesem Wege die gleichen kleinen Dosen oder noch kleinere wirksam sind (was in den beiden vorstehenden Arbeiten, nebenbei gesagt, *nicht* erwiesen ist).

Insofern berührt diese Streitfrage also doch die Hygiene, und auch von *hygienischen* Gesichtspunkten aus ist uns an ihrer Erledigung gelegen. — In dieser Erkenntnis haben meine Mitarbeiter und ich vergleichende Versuche über die Möglichkeit des Eindringens der Tröpf-



chen in die Lunge angestellt, nicht durch pathologisch-anatomische Untersuchungen, sondern durch vergleichende Tierversuche.

Das Ergebnis dieser Versuche, wie ich es schon 1908 kurz zusammengestellt habe, ist etwa folgendes:

1. Nach Inhalation unbelebter Staubteile gelingt kurz nachher ihr makro- und mikroskopischer Nachweis in den Bronchiolen und Alveolen (ich halte dies trotz *Haras* entgegengesetzter Ergebnisse aufrecht).

2. Nach Inhalation von Schimmelpilzsporen finden sich die Sporen ganz kurz nachher in den Alveolen (*Ballin*).

3. Nach Inhalation versprayter Aufschwemmungen von Prodigiosus oder Megatheriumsporen wuchsen aus den peripheren Teilen der Lunge, die noch intra vitam oder kurz nach dem Versuch in Nährboden gebracht wurden, große Mengen der betreffenden Keime (*Nenninger*, *Paul*).

4. Nach Inhalation von versprayter Aufschwemmung von Tuberkel bacillen konnten bei mittleren Dosen (10000 Bacillen) biologisch durch Überimpfung von peripheren Lungenstückchen auf Meerschweinchen rasch (1 Stunde) nach der Inhalation Tuberkel nachgewiesen werden; bei größeren Dosen gelang auch der mikroskopische Nachweis (*Heymann*).

5. Die Inhalation von reichlichen versprayten Tuberkelbacillen ergibt schon nach 16—21 Tagen ausnahmslos eine sehr ausgebreitete Lungentuberkulose mit unzähligen Knötchen, während die Abdominalorgane frei bleiben oder erst Anfänge von Krankheitsherden zeigen (*Findel*).

6. Dieselben Versuche an *tracheotomierten* Tieren (Kalb, Hunde), nach vollständigem Verheilen der Tracheotomiewunde vorgenommen, ergaben genau das gleiche Resultat. Die Lungentuberkulose trat nach Inhalation von 4 Millionen Bacillen ein, während die Verfütterung von 6 Milliarden Bacillen ohne jede Wirkung blieb (*Findel*).

7. Meerschweinchen, den Hustentröpfchen von Phthisikern ausgesetzt, akquirieren vorzugsweise primäre Lungentuberkulose; bei geringer Tröpfchenaufnahme Tuberkulose verschiedenster Drüsen und Organe (*Chaussé*, *Hippke*).

Die völlig beweisende Reihe dieser Versuche kennen offenbar *Jos. Koch* und *Baumgarten* nicht vollständig, namentlich nicht die unter 2, 3, 6 augeführten. Zu den unter 3 und 4 aufgeführten Versuchen wird von ihnen *Haras* Behauptung reproduziert, sie seien zu spät nach der Inhalation vorgenommen; während tatsächlich sogar intra vitam der erste Nachweis der in die Alveolen eingeatmeten Keime geliefert wurde. — *Gar nicht* erwähnt sind die besonderen Versuche an *tracheotomierten* Tieren, die mit völligem Ausschluß der Aufnahme durch die Nasen- und Mundschleimhaut angestellt wurden. Diese gerade sind am beweisendsten dafür, daß die oralen Lymphbahnen nicht den notwendigen und üblichen Weg darstellen, auf dem die inhalierten Bacillen in die Lunge eindringen.



Allerdings identifizieren *Jos. Koch* und *Baumgarten* ihre Ergebnisse nicht ganz mit denen, die wir damals bekämpft haben und gegen die unsere Versuche gerichtet waren. Sie geben zu, daß bei der *Verfütterung* der gleichen Menge von Tuberkelbacillen, welche bei Tröpfcheninhalation sicher infizieren, keine Erkrankung erfolgt, sie wenden aber ein, daß hierbei die orale Infektion nicht stattfinden könne, weil die Schleimhaut des Mundes zu kurze Zeit und in ungeeigneter Weise mit den Bacillen in Berührung komme, daß dies dagegen bei der Aufnahme von Tröpfchen und bei der Schmutz- und Schmierinfektion der Fall sei. Vom hygienischen Standpunkt sind demnach die Tröpfcheninfektion und die Schmutz- und Schmierinfektion gleichwertig und deshalb gefährlich, weil bei beiden Gelegenheit zum Eindringen in die oralen Lymphbahnen und durch diese in die Lunge gegeben sei. Als dritter Infektionsweg wird dann derjenige durch die Conjunctiva den beiden vorigen an die Seite gestellt.

Aber darin stimmen sie mit den früheren Gegnern der Inhalationstuberkulose vollkommen überein, daß die Bacillen, mögen sie inhaliert sein, oder von beschmutzten Fingern stammen, oder von der Conjunctiva ausgehen, Halsdrüsentuberkulose und von dieser aus Erkrankung der Lungen machen, daß sie aber nicht bis in die feineren Bronchien eingeatmet werden und sich hier festsetzen können.

Zu dieser Auffassung kommen sie dadurch, daß sie angeblich ganz das gleiche Krankheitsbild erhielten, mochten sie die Infektion durch isolierte Tröpfchen, oder durch Einträufeln einer Tuberkel-Aufschwemmung in den Mund, oder durch Einträufeln in die Conjunctiva hervorrufen.

Darin kann ich jedoch *Jos. Koch* und *Baumgarten* nicht beistimmen. Bei der Durchsicht ihrer Protokolle fällt es auf, daß bei Tröpfcheninhalation 65% der Tiere *nur* ausgebreitete Lungentuberkulose zeigten, keine Erkrankung der Drüsen und der anderen Organe (ähnlich wie bei *Findels* Versuchen); daß dagegen nach dem Einträufeln in den Mund oder auf die Conjunctiva nur ausnahmsweise reine Lungentuberkulose, in der Hauptsache aber Tuberkulose der Halsdrüsen, der Milz und anderer Organe, eventuell neben Lungentuberkulose gefunden wurde. Nach conjunctivaler Injektion kam es sogar vor, daß *nur* eine Milzerkrankung festzustellen war, während die Lungen *frei* von Tuberkulose gefunden wurden.

Das ist meiner Ansicht nach genau das, was auf Grund unserer früheren Versuche zu erwarten war. Wir haben nie behauptet, daß *jede* Lungentuberkulose auf direkt aus den in die Bronchien inhalierten Keimen zurückzuführen sei und daß auf anderem Wege keine Lungentuberkulose entstehe. Auch bei andersartiger Einverleibung der Bacillen wird sich Lungentuberkulose ausbilden können. Aber die charakteristische Durchsetzung der Lunge mit einer *Unzahl von Knötchen nach kürzester Zeit, ohne daß in einem anderen Organ* Herde gefunden werden, sieht man doch nur bei Versuchen mit *inhalierten* Bacillen.

Daß manchmal die Erkrankung etwas abweichenden Verlauf nimmt, und daß namentlich die Halsdrüsen in sehr verschiedener Weise ergriffen werden, das liegt vermutlich an zufälligen und individuellen Differenzen. Bei manchen Tieren wird nicht die berechnete Anzahl Bacillen in die Bronchien gelangen, sondern viel weniger, und dafür bekommen die Schleimhäute des Rachens mehr ab; oder es spielen Schleimhautdefekte hinein, die ein ausnahmsweise rasches Ergriffenwerden auf dem Lymphwege herbeiführen. Aus solchen Befunden wird man aber nicht schließen dürfen, daß folglich der Weg über die Lymphdrüsen der *gewöhnlich* eingeschlagene ist. *Jos. Koch* und *Baumgarten* fragen: „Weshalb sollten Tuberkelbacillen, die durch die Inhalation auf die Schleimhaut des oberen Respirationstraktus geraten sind, nicht den natürlichen und physiologischen Weg über die entsprechenden Lymphbahnen einschlagen?“ Ich möchte die Gegenfrage stellen: „Weshalb sollten Tuberkelbacillen, die mit Tröpfchen inhaliert sind, nicht den natürlichen, offenen Weg in die Bronchien nehmen, in den sie durch den Einatemstrom hineingerissen werden?“

Diese letztere Vorstellung bietet nur für diejenigen Schwierigkeiten, die sich nicht durch eigene Versuche außerhalb des Tiers überzeugt haben, daß z. B. durch enge gewundene Glasrohre, deren Innenwand mit klebriger Flüssigkeit ausgekleidet ist, doch immer noch durch einen axialen Strom beträchtliche Mengen versprayter Tröpfchen oder verstäubter Pulver hindurchgetrieben werden können. Wir finden dementsprechend an dem Vordringen der Tröpfchen in die Bronchien unter dem Einfluß des starken Inspirationsstroms nichts Besonderes, sondern etwas, was nach physikalischen Gesetzen notwendig erfolgen *muß*.

Daß *Jos. Koch* und *Baumgarten* diesen Inhalationsweg nur ganz ausnahmsweise gelten lassen, geht aus einer Stelle ihrer Arbeit hervor, wo die Verf. sagen: „Die Möglichkeit, daß beim Einatmen Bacillen in die Lunge der Versuchstiere geraten können, kann auf Grund physikalisch-theoretischer Erwägungen und Versuche nicht in Abrede gestellt werden; aber *in der Regel* werden die bacillenhaltigen Tröpfchen zunächst von den Lymphbahnen der oberen Atemwege aufgenommen und auf diesem Wege dem Blute zugeführt.“

Mir scheint dies keineswegs erwiesen zu sein, nachdem in den eigenen Versuchen der Verfasser 65% jenen Befund von *alleiniger* Lungentuberkulose bei den Versuchstieren ergeben haben.

Daß das Aufträufeln einer Aufschwemmung von Bacillen leichter zu einer oralen Infektion führt, als die Verfütterung, mag zugegeben werden; aber auch diese orale Infektion verlangt einstweilen nach den Versuchen der Verfasser *sehr* große Dosen. In wie weit der innige Kontakt mit einer großen resorbierenden Schleimhautfläche dabei die Infektion erleichtert, und ob nicht andere Momente, z. B. die quantitativ



wechselnde Spülung durch die Sekrete oder Epitheldefekte oder gelegentliche kleine Wunden auf den Erfolg von Einfluß sind, das ist meines Erachtens noch unentschieden.

Schließlich noch ein Wort über die *hygienischen* Folgerungen, nämlich über die Infektionsgefahr, die den Menschen in der Schmutz- und Schmierinfektion und in dem Auftreffen von Hustentröpfchen auf die Conjunctiva bedrohen.

Wenn ich die Schmutz- und Schmierinfektion als überschätzt und jetzt nicht mehr so verbreitet wie früher bezeichnet habe, so haben mich zu dieser Ansicht sorgfältige Untersuchungen in einer großen Anzahl von Phthisikerwohnungen veranlaßt, die wir uns in Breslau und Berlin durch die Fürsorgestellen und verschiedene Armenärzte hatten aussuchen lassen. *Heymann*, *Ostermann*, *Köhlisch* u. a. haben teils zahlreiche Proben vom Fußboden und anderen Teilen solcher Wohnungen, teils von den Fingern der Insassen, namentlich der Kinder, entnommen; durch alle diese Untersuchungen mußten wir zu der Auffassung kommen, daß ein *so* sorgloses Umgehen mit dem Sputum und ein solches Exponieren der Kinder *wie früher* jetzt kaum mehr vorkommt. Natürlich findet man es noch hier und da; aber in Prozenten ausgedrückt sind diese Fälle totaler Verwahrlosung seltener geworden. Ich muß diese Ansicht aufrechterhalten, bis ich durch neue Erfahrungen und Erhebungen in der Praxis der Tuberkulosefürsorge, nicht aber durch *Überlegungen*, wie es *Jos. Koch* und *Baumgarten* wollen, zu einer anderen Auffassung bekehrt bin.

Die schon seit 10 Jahren von *Calmette* gelehrte *conjunctivale* Infektion wird von *Jos. Koch* und *Baumgarten* ebenfalls stark überschätzt. Sie soll angeblich mit sehr kleinen Dosen gelingen; aber gerade in den Versuchen mit *wenig* Bacillen ist der tuberkulöse Befund nicht einmal durch Weiterverimpfung der verdächtigen Gewebsteile sicherzustellen gewesen. — Hiervon abgesehen, steht, wenn wir auch die *Häufigkeit* der Infektionsgefahr berücksichtigen, die Gelegenheit, daß Tuberkelbacillen auf die Conjunctiva geraten, bei weitem zurück hinter der Gefahr, durch Inhalation solche in Nase und Mund zu bekommen, weil der mehrere Meter pro Sekunde starke Inspirationsstrom die Tröpfchen mit großer Energie in Mund und Nase hinein- und von der Conjunctiva hinwegführt. Fördert doch dieser Strom pro Minute mehr als 6 Liter Luft; er saugt daher alle ausgehusteten feinen Tröpfchen aus weitem Umkreis in seinen Bereich, und selbst während des Exspiriums hält die gegen die Atemöffnungen gerichtete Strömung an. Nur relativ grobe Partikel werden sich dieser Bewegung entziehen und durch Verschleudern bei kurzem Abstand auf die Conjunctiva gelangen können. Das bedeutet aber ein seltenes Vorkommnis, gar nicht vergleichbar mit den gewöhnlich verstreuten Hustentröpfchen. Man könnte einwenden, daß doch



wir selbst mehrfach eine Erkrankung des Auges bei angehusteten Meerschweinchen beobachtet haben. Diese Tiere aspirieren aber mit einem 100 mal kleineren Blasebalg und vermögen deshalb gewiß nicht mit der gleichen Energie alle Tröpfchen den Atemöffnungen zuzuführen, wie es beim Menschen zweifellos geschieht. Deshalb gelingen vermutlich auch Infektionen durch menschliche Hustentröpfchen beim Meerschweinchen viel schwerer, als beim Menschen selbst. — Es ist daher nicht richtig, wenn *Jos. Koch* und *Baumgarten* die beiden Möglichkeiten, daß bacillenhaltige Tröpfchen, durch den Hustenstoß eines Phthisikers herausgeschleudert, auf die Nasenschleimhaut, *oder* auf die des Augenbindehautsacks gelangen, als gleichwertig nebeneinander stellen.

Wichtig wäre es allerdings gewesen, wenn *Jos. Koch* und *Baumgarten* durch ihre Versuche mit Bestimmtheit hätten erweisen können, daß bei der Methode des Einträufelns die orale Infektion mit sehr viel kleineren Bacillenmengen und in kürzerer Zeit gelingt, als zur Infektion vom Darm aus erforderlich sind, womöglich mit ähnlich kleinen Dosen, wie sie von *Findel* für die Inhalation noch als sicher wirksam gefunden wurden. Die von *Koch* und *Baumgarten* gewählten Dosen für die orale Aufnahme eingeträufelter Bacillen liegen aber *so hoch*, daß, wenn diese Bacillenmengen in *Tröpfchen* inhaliert wären, die Tiere *unbedingt* durch den direkt in die Lungen inhalierten Anteil rasch zugrunde gegangen wären, *nicht* durch die oral aufgenommenen Bacillen und die daran sich anschließende langsamer vorschreitende Lymphdrüsentuberkulose. Es würde daher von Interesse sein, die bei oraler Infektion noch eben wirksame Minimaldosis kennenzulernen; *Reichenbach* hat dazu bereits den Anfang gemacht. Aber ein Vorgehen mit so gewaltigen Dosen, wie es *Jos. Koch* und *Baumgarten* getan haben, kann uns nicht zu einer Aufklärung über die Gefährlichkeit dieses Infektionsmodus verhelfen.

An unserer bisherigen *hygienischen* Auffassung ist also, wie auch *Jos. Koch* und *Baumgarten* hervorheben, einstweilen nichts zu ändern. Die conjunctivale Infektion spielt sicher keine erhebliche Rolle; von der oralen steht es noch dahin, ob sie auch bei einmaligen sehr kleinen Dosen, die zur direkten Lungeninfektion nicht ausreichen, in Kraft tritt und tuberkulöse Erkrankungen hervorruft, oder ob sie nur bei großen Dosen eine mehr nebensächliche Rolle neben der Lungenaffektion spielt, oder ob — was nicht vernachlässigt werden darf — bei der *natürlichen* Infektion des Menschen die doch zumeist oft *wiederholten*, bald stärkeren bald geringeren Invasionen der beim Husten verstreuten Tröpfchen die Erkrankung beeinflussen. Vorläufig müssen wir jedenfalls an der Auffassung festhalten, daß wohl kein Infektionsweg mehr Gefahren bietet und häufiger betreten wird als die Einatmung von Hustentröpfchen.

# Autorenverzeichnis.

ıren.

Über
idie-
137.
*Carl*
iobe
inti-

ver-
ole-
ıle-
74.
che
ver-
fen.

ens-
von
. auf

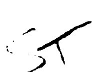
und

gall.
hun-
ener
der

neu-
ung.
bei
ı III

mo-
ung.
von
nin-

no-
ng.
no-
ta-







13062

